



RCI/FR 2004 / 000354

27 FEV. 2004

REC'D 28 MAY 2004

WIPO PCT

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

29 JAN. 2004

Fait à Paris, le \_\_\_\_\_

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, enclosed in an oval border, which appears to read 'Martine PLANCHE'.

Martine PLANCHE

#### DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
[www.inpi.fr](http://www.inpi.fr)



INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

**INPI Direct** 0 825 83 85 87  
0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Réserve à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

**14 MAI 2003**

LIEU

**75 INPI PARIS**

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE  
PAR L'INPI

**0305768**

**14 MAI 2003**

Vos références pour ce dossier

(facultatif) **240589 D20701 BF**

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11354\*03

### REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 © W / 030103

**[1] NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**

**Cabinet REGIMBEAU  
20, rue de Chazelles  
75847 PARIS CEDEX 17  
FRANCE**

#### Confirmation d'un dépôt par télécopie

#### **[2] NATURE DE LA DEMANDE**

Demande de brevet

Demande de certificat d'utilité

Demande divisionnaire

*Demande de brevet initiale*

*ou demande de certificat d'utilité initiale*

Transformation d'une demande de  
brevet européen *Demande de brevet initiale*

#### **[3] TITRE DE L'INVENTION** (200 caractères ou espaces maximum)

MICROORGANISME A ACTIVITE METHIONINE SYNTHASE MODIFIEE ET PROCEDE DE PREPARATION DE LA  
METHIONINE.

#### **[4] DECLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE**

Pays ou organisation **FRANCE**

Date **18 02 2003**

N° **0301924**

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

**S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»**

#### **[5] DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)**

Nom  
ou dénomination sociale

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile  
ou  
siège

Rue

Code postal et ville

Pays

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

**METABOLIC EXPLORER**

**423703107**

**BIOPOLE CLERMONT-LIMAGNE 63360 SAINT BEAUZIRE, FR**

**FRANCE**

**Française**

**N° de télécopie (facultatif)**

**S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»**

Remplir impérativement la 2<sup>me</sup> page

BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE  
page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES	Reservé à l'INPI
DATE	14 MAI 2003
LIEU	75 INPI PARIS
N° D'ENREGISTREMENT	0305765
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

DB 540 W / 030103

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>	
Nom _____	
Prénom _____	
Cabinet ou Société _____	
N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel _____	
Adresse	Rue _____
	Code postal et ville _____
	Pays _____
N° de téléphone (facultatif) _____	
N° de télécopie (facultatif) _____	
Adresse électronique (facultatif) _____	
<b>7 INVENTEUR (S)</b>	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes _____	
<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>	
Établissement immédiat ou établissement différé _____	
<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements) _____	
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>	
<input type="checkbox"/> Unique pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG _____	
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	
Le support électronique de données est joint	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes	
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)	
 92-1001	
<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>	
M. ROCHET	

## Microorganisme à activité méthionine synthase modifiée et procédé de préparation de la méthionine

5 La présente invention se rapporte au domaine de la bioconversion et d'obtention d'acides aminés par fermentation de microorganismes. Elle se rapporte à une méthode de criblage et d'évolution dirigée permettant d'identifier une souche de microorganisme, éventuellement génétiquement modifié, possédant une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée, ladite souche produisant de l'acide 2-Amino-4-(alkylmercapto)butyrique, en particulier de la L-méthionine (acide 2-Amino-4-(méthylmercapto)butyrique). L'invention concerne également la souche de microorganisme, les enzymes améliorées et à leurs séquences codantes. L'invention concerne enfin un procédé de préparation de la méthionine par culture de ladite souche de microorganisme.

10 15 La DL-Methionine est produite industriellement par synthèse chimique. Le méthyl-mercaptopan réagit avec l'acroléine pour produire le  $\beta$ -méthyl thiopropionaldéhyde, qui réagit avec l'hydrogène cyanide pour produire l' $\alpha$ -hydroxy- $\gamma$ -méthyl-thio-butyro-nitrile. Après traitement avec l'ammoniac, et une hydrolyse, on obtient la méthionine.

20 25 Tous les producteurs industriels de la DL-methionine utilisent les mêmes matières premières à savoir l'acroléine, le méthane thiol (méthyl-mercaptopan), l'hydrogène cyanide et l'ammoniac ou l'ammonium carbonate. Le procédé de synthèse du mélange racémique peut être conduit en batch ou en continu.

Un procédé industriel combine à la synthèse chimique de la biocatalyse par l'utilisant l'amino acylase, enzyme produite par *Aspergillus oryzas* pour obtenir uniquement la L-méthionine à partir de la DL-méthionine.

Les brevets US 6,379,934 et EP 1 055 730 se rapportent à la production d'acides aminés en utilisant une souche de bactéries corynéformes, dans laquelle le gène *accBC* est amplifié. La méthionine est mentionnée, mais seule la préparation de L-lysine est exemplifiée.

Toutefois, la synthèse d'acides aminés soufrés culture de microorganisme reste difficile à mettre en œuvre à des niveaux susceptibles de conduire à une

exploitation industrielle, notamment du fait de la complexité de leurs voies de biosynthèse et de nombreux mécanismes de régulation.

En effet, le métabolisme de la méthionine, est fortement régulé, la régulation de son métabolisme se faisant à plusieurs niveaux (Weissbach et al., 1991, Mol.

5 Microbiol., 5, 1593-1597) :

- métabolisme carboné pour la fabrication de la L-sérine à partir du glycerate3P, de la L-homosérine à partir de l'aspartate et de l'acétyl-CoA
- métabolisme du soufre pour la fabrication de la L-cystéine à partir de la L-sérine, de l'acétyl-CoA et du sulfate du milieu de culture
- 10 - synthèse de la méthionine (Fig. 1) à partir de la L-homosérine, de la cystéine et d'acétyl-CoA ou succinyl-CoA.

La demande WO 93/17112 décrit les différentes enzymes impliquées dans la biosynthèse de la méthionine à partir de l'acide L-aspartique dans divers organismes. Cette demande de brevet décrit également l'introduction dans un microorganisme de 15 plusieurs gènes exogènes agissant vde manière séquentielle pour la synthèse de la méthionine, employant du mléthyl-mercaptop ou du sulfure d'hydrogène comme source de soufre.

La présente invention se rapporte à des souches de microorganismes en 20 particulier des bactéries, notamment *E. coli* et les corynétbactéries, produisant de l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique de formule générale (I)



dans laquelle R représente un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 18 atomes de carbones, éventuellement substitué par un ou des groupe(s) hydroxy, 25 ou un radical aryle ou hétéroaryle comprenant un ou plusieurs atomes d'azote ou de soufre dans le cycle hétéroaromatique, sélectionné parmi les groupes phényle, pyridyle, pyrolyle, pyrazolyle, triazolyle, tiazolyle, ou thienyle,

par métabolisme d'une source de carbone simple et d'une source de soufre comprenant un composé de formule générale (II) :

30  $\text{R}'\text{-SH (II)}$

dans laquelle R' représente un atome d'hydrogène ou R, R étant défini précédemment, et ses sels physiologiquement acceptables,

les dites souches présentant au moins une gène codant pour une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée.

Par enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée, on entend selon l'invention toute enzyme impliquée dans la biosynthèse des acides 2-amino-4-(alkylmercapto)butyriques de formule générale (I) par conversion d'un substrat dérivé de formule générale (III)



dans laquelle R'' représente un radical acyle de préférence choisi parmi le radical succinyle ou le radical acétyle,

- 10 soit par conversion directe du substrat en acide de formule générale (I),
- soit par conversion du substrat en homocystéine de formule générale (IV)



laquelle est ensuite transformée en acide de formule générale (I) par une enzyme appropriée.

- 15 Les enzymes à activité « méthionine synthase » modifiée sont des enzymes modifiées par rapport aux enzymes natives pour leur permettre de réaliser de manière préférentielle la conversion directe du substrat de formule générale (III) en acide de formule générale (I) ou en homocystéine de formule générale (IV) au lieu de la réaction catalysée par l'enzyme native. Cette modification, appelée encore mutation,
- 20 consiste essentiellement en ce que l'enzyme modifiée ait une plus grande affinité pour le composé soufré de formule générale (II) que pour son co-substrat naturel.

Par source de carbone simple, selon la présente invention, on entend des sources de carbone utilisables par l'homme du métier pour la croissance normale d'un microorganisme, d'une bactérie en particulier. On entend désigner notamment les différents sucres assimilables, tels le glucose, le galactose, le saccharose, le lactose ou les mélasses, ou les sous-produits de ces sucres. Une source de carbone simple tout particulièrement préférée est le glucose. Une autre source de carbone simple préférée est le saccharose.

Par sel physiologiquement acceptable, on entend selon l'invention les sels du composé de formule générale (I) qui n'affectent pas le métabolisme et la capacité de croissance de la souche de microorganisme selon l'invention, notamment les sels de métaux alcalins comme le sodium.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, R représente un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 4 atomes de carbone, en particulier choisi parmi les radicaux méthyle, éthyle, n-propyle, i-propyle, n-butyle, i-butyle ou t-butyle. De manière plus préférentielle, R représente le radical méthyle.

5 L'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique de formule générale (I) obtenu est de préférence la L-méthionine.

10 L'utilisation d'une source de carbone simple et d'un composé soufré de formule (II) pour la production d'acide de formule (I) par bioconversion présente *a priori* plusieurs avantages, notamment :

- la synthèse de l'acide (I), comme la méthionine, en une ou deux étapes à partie à partir d'O-acyl-L-homosérine, devient indépendante de la synthèse de la cystéine voire également du cycle du tétrahydrofolate ;
- les composés soufrés de formule (II), comme le méthyl-mercaptopan, qui sont des matières premières généralement toxiques issues de la pétrochimie, peuvent être valorisés dans la synthèse d'acides aminés à haute valeur ajoutée.

15 L'invention est basée sur le fait que l'on peut obtenir, de façon dirigée, une modification de l'activité « méthionine-synthase » de la cystationine-γ-synthase (EC 4.2.99.9 ; GenBank AAN83320, ou AAA24167) en présence de méthyl-mercaptopan.  
20 Cette enzyme de la voie de biosynthèse de méthionine, codée par le gène *metB* chez *E. coli* (Fig. 2) et *C. glutamicum*, présente une activité pour un large spectre de substrats (Flavin, M. ; Slaughter, C. (1967) Enzymatic synthesis of homoserine or methionine directly from O-succinyl-homoserine. *Biochim. Biophys. Acta* 132: 400-405).

25 L'invention est aussi basée sur le fait que l'on peut obtenir, de façon dirigée, une modification de l'activité « méthionine-synthase » de l'O-acétyl-L-homosérine sulphydrolase (ou O-acétyl-L-homosérine sulphydrylase, C 4.2.99.10) en présence de méthylmercaptopan. Cette enzyme de la voie de biosynthèse de méthionine, codée par le gène *metY* chez *C. glutamicum* (Genbank AF220150), présente une activité pour un large spectre de substrats (Smith IK, Thompson JF. (1969) Utilization of S-methylcysteine and methylmercaptopan by methionineless mutants of Neurospora and the pathway of their conversion to methionine. II. Enzyme studies. *Biochim Biophys Acta* 184(1):130-8).

L'invention concerne donc également un procédé de préparation des souches selon l'invention et leur utilisation dans un procédé de préparation d'un acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique de formule générale (I), de préférence de la L-méthionine.

Le procédé de préparation de souches selon l'invention consiste à obtenir, à partir d'une souche bactérienne initiale, une souche bactérienne génétiquement modifiée présentant au moins une modification dans un gène codant pour une enzyme à activité « méthionine synthase », ledit procédé comprenant une étape consistant à soumettre ladite souche bactérienne initiale à une pression de sélection en présence du composé de formule (II) défini ci-dessus, afin de diriger une évolution dudit gène codant pour ladite enzyme à activité « méthionine synthase » dans ladite souche bactérienne, vers un gène codant pour une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée par rapport à ladite souche bactérienne initiale.

Une activité « méthionine synthase » est améliorée dans la souche (A) de microorganisme par rapport à la souche (I) initiale lorsque la production de méthionine dans les mêmes conditions de culture (dans un milieu contenant une quantité efficace de dérivé soufré de formule (II)) est supérieure pour la souche (A) que pour la souche (I). Cette amélioration est préférentiellement observée par étude de la quantité de méthionine produite. Dans certains cas, on peut observer cette amélioration par l'augmentation du taux de croissance de la bactérie (A) par rapport au taux de croissance de la bactérie (I), dans un milieu minimum ne contenant pas de méthionine.

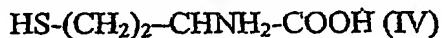
La présente invention concerne également les souches à activité « méthionine synthase » améliorée susceptibles d'être obtenues par le procédé de sélection selon l'invention et comprenant au moins un gène codant pour une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée telle que définie précédemment et ci-après.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée permet la conversion directe du substrat de formule générale (III) en acide de formule générale (I). Dans ce cas, la source de soufre est un

composé de formule générale (II) pour laquelle R' représente le radical R défini précédemment.

L'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est choisie parmi les cystathionine- $\gamma$ -synthases et les acylhomosérine sulfhydrylases.

- 5 Selon un deuxième mode de réalisation de l'invention, l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée permet la conversion du substrat de formule générale (III) en homocystéine de formule générale (IV)



- 10 laquelle est ensuite transformée en acide de formule générale (I) par une enzyme appropriée. Dans ce cas, la source de soufre est un composé de formule générale (II) pour laquelle R' représente un atome d'hydrogène, préférentiellement du sulfure d'hydrogène. La source de soufre H<sub>2</sub>S peut-être introduite dans le milieu de culture ou bien être produite par la bactérie à partir d'une source de soufre simple, par exemple un sulfate.

- 15 L'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est avantageusement choisie parmi les cystathionine- $\gamma$ -synthases et les acylhomosérine sulfhydrylases.

- 20 L'homme du métier saura sélectionner d'autres enzymes à activité « méthionine synthase » modifiée en fonction de leur capacité à évoluer pour effectuer la réaction enzymatique « méthionine synthase » modifiée telle que définie précédemment. On citera notamment les cystéines synthases A et B, codées par les gènes cysK et cysM chez les bactéries.

Pour les cystathionine- $\gamma$ -synthases modifiées définies précédemment et ci-dessous, le substrat est avantageusement la O-acétyl-L-homosérine ou la O-succinyl-L-homosérine, de préférence la O-succinyl-L-homosérine.

- 25 Pour les acylhomosérine sulfhydrylases modifiées définies précédemment et ci-dessous, le substrat est avantageusement la O-succinyl-L-homosérine ou la O-acétyl-L-homosérine, de préférence la O-acétyl-L-homosérine.

- 30 Pour ces deux enzymes, la modification consiste essentiellement en une mutation de manière à ce que la transformation du substrat de formule générale (III) se fasse de manière préférentielle avec le composé de formule générale (II) plutôt qu'avec la L-cystéine.

La mutation des enzymes peut être obtenue par la mise en œuvre du procédé de préparation de souches à activité « méthionine synthase » améliorée selon

l'invention par culture sous pression de sélection en présence du composé de formule générale (II).

Dans ce cas, le gène comprenant la séquence codant pour la cystathionine- $\gamma$ -synthase ou l'acylhomosérine sulfhydrylase est

- 5     ◦ soit un gène natif, présent dans le génome de la souche initiale (I) où il est exprimé pour permettre la traduction de l'enzyme correspondante,
- soit une un gène hétérologue comprenant une séquence codant pour une cystathionine- $\gamma$ -synthase ou une acylhomosérine sulfhydrylase, sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression et sa traduction dans la
- 10    ◦ souche initiale (I) où il aura été introduit.

La mutation peut également être obtenue par mutagénèse dirigée,

- soit directement sur le gène natif présent naturellement dans la souche initiale (I), notamment par recombinaison homologue,
- soit par des techniques usuelles de mutagenèse dirigée sur des séquences codant
- 15    ◦ pour une cystathionine- $\gamma$ -synthase ou une acylhomosérine sulfhydrylase, introduite ensuite dans la souche initiale (I) sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression et sa traduction dans ladite souche initiale (I) où il aura été introduit.

- 20           De tels éléments de régulation sont bien connus de l'homme du métier, et comprennent des séquences de régulation promotrice, ou promoteurs, en particulier des promoteurs dits promoteurs forts constitutifs chez les microorganismes. De préférence, le promoteur fort constitutif est choisi parmi pTAC-O (SEQ ID N° 1), pLAC-O (SEQ ID N° 2), pTRC-O (SEQ ID N° 3), pTHLA (SEQ ID N° 4),
- 25    ◦ promoteurs forts pour lesquels l'opérateur lac a été déleté pour les rendre constitutifs.

30           De manière avantageuse, les cystathionine- $\gamma$ -synthases « initiales » ou à activité « méthionine synthase » non modifiée sont sélectionnées parmi les cystathionine- $\gamma$ -synthases correspondant au PFAM référence PF01053 et au COG référence CPG0626.

Les PFAM (Protein families database of alignments and Hidden Markov Models ; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) représentent une large collection

d'alignements de séquences protéiques. Chaque PFAM permet de visualiser des alignements multiples, de voir des domaines protéiques, d'évaluer la répartition entre les organismes, d'avoir accès à d'autres bases de données, de visualiser des structures connues de protéines.

5 Les COGs (Clusters of Orthologous Groups of proteins ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) sont obtenus en comparant les séquences protéiques issus de 43 génomes complètement séquencés représentant 30 lignées phylogénétiques majeurs. Chaque COG est défini à partir d'au moins trois lignées ce qui permet ainsi d'identifier des domaines conservés anciens.

10 De manière préférentielle, la cystathionine- $\gamma$ -synthase est la cystathionine- $\gamma$ -synthase de E. coli K12, représentée sur la SEQ ID NO : 6, et les séquences homologues de cette séquence présentant une activité cystathionine- $\gamma$ -synthase et comprenant au moins 80% d'homologie, préférentiellement 90% d'homologie, plus préférentiellement 95% d'homologie avec la séquence d'acides aminés de la SEQ ID  
15 NO 6.

Les moyens d'identification des séquences homologues et de leur pourcentages d'homologie sont bien connus de l'homme du métier, comprenant notamment le programme BLAST, et notamment les programme BLASTP, qui peut être utilisé à partir du site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> avec les paramètres  
20 indiqués par défaut sur ce site.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la cystathionine- $\gamma$ -synthase initiale, avant modification, comprend une séquence d'acide aminés ci-dessous dans sa partie C-terminale (zone conservée 1)

X1-X2-X3-L-G-X4-X5-X6-X7-X8-X9

25 dans laquelle

X1 représente A,G,S, de préférence A

X2 représente E,V,P,T, de préférence E

X3 représente S,T,N, de préférence S

X4 représente G,D,A,H,T, de préférence G

30 X5 représente V,A,T,H,N, de préférence V

X6 représente E,R,K,F, de préférence E

X7 représente S,T, de préférence S

X8 représente L,I,V,A, de préférence L et

X9 représente I,V,A,T, de préférence I.

De manière préférentielle, la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée, selon l'invention comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie C-terminale :

5 A-E-S-L-G-G-V-E-S

De manière avantageuse, la cystathionine  $\gamma$ -synthase initiale, avant modification, comprend également au moins une séquence d'acide aminé ci-dessous dans sa partie N-terminale (zone conservée 2) :

X10-X11-Y-X12-R-X13-X14-X15-X16-X17-X18

10 dans laquelle

X10 représente H,Y,F,L,K, de préférence A

X11 représente E,D,K,R,V,I, de préférence Y

X12 représente S,A,T,P,G, de préférence S

X13 représente I,S,T,R,E,F,W,D, de préférence S

15 X14 représente S,G,A,I,E,N,K,P, de préférence G

X15 représente N,H,Q,S, de préférence N

X16 représente P,D,L, de préférence P

X17 représente T,M,N,G,S, de préférence T et

X18 représente R,L,V,S,W,E, de préférence R.

20 Les acides aminés X1 à X9 correspondent aux résidus 324 à 334 de la séquence de cystathionine  $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12, représenté sur la SEQ ID NO 6.

Les acides aminés X10 à X18 correspondent aux résidus 44 à 54 de la séquence de cystathionine  $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12, représenté sur la SEQ ID NO 6.

25 Les positions des acides aminés employées ci-dessus et ci-après sont entendues comme étant des positions relatives faites par référence à la séquence de cystathionine- $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12. L'homme du métier saura bien entendu retrouver les acides aminés correspondants sur d'autres séquences de cystathionine- $\gamma$ -synthases, par l'emploi d'outils usuels d'alignement de séquences. On citera notamment le programme BLAST, qui peut être utilisé à partir du site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> avec les paramètres indiqués par défaut sur ce site. L'alignement de séquence pourra être effectué tant au niveau de la protéine (SEQ

ID NO 6) que de sa séquence codante, comme par exemple la séquence codante représentée sur la SEQ ID NO 5.

On peut aussi avantageusement utiliser la recherche avancée de BlastP en affinant la recherche avec un motif (PHI-BLAST). Dans ce cas on pourra prendre le 5 motif [AGS]-[EVPT]-[STN]-L-G-[GDAHT]-[VATHN]-[ERKF]-[ST]-[LIV.A]-[IVAT] pour une première zone conservée et le motif x(2)-Y-[SATPG]-R-x(2)-[NHQS]-[PDL]-[TMNGS]-[ RLVSWE] pour une deuxième zone conservée où les lettres indiquées en gras correspondent aux acides aminés majoritairement présent à cette position dans la séquence, et où x correspond à n'importe quel acide aminé. Le 10 chiffre 2 entre parenthèse signifie qu'il y a deux acides aminés indéterminés.

Pour l'alignement des séquences, on peut utiliser les programmes CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) ou MULTALIN (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>), avec les paramètres indiqués par défaut sur ces sites.

15 Un tel alignement de séquences est représenté sur la figure 5 pour une sélection de différentes cystathionine- $\gamma$ -synthases.

Elles sont de préférence choisies parmi les cystathionine- $\gamma$ -synthase (CGS) suivantes :

- Q9ZMW7 O-succinylhomoserine (Thiol)-lyase, Helicobacter pylori
- 20 P46807 O-succinylhomoserine (Thiol)-lyase, Mycobacterium leprae
- AAO29646 Xylella fastidiosa Temecula1
- NP\_638204 Xanthomonas campestris pv. campestris str. ATCC 33913
- NP\_358970 Streptococcus pneumoniae R6
- NP\_126586 O-succinylhomoserine (Thiol)-lyase, Pyrococcus abyssi
- 25 NP\_373671 Staphylococcus aureus subsp. aureus N315
- NP\_418374 [Escherichia coli K12
- NP\_601979 Corynebacterium glutamicum ATCC 13032
- NP\_343729 O-succinylhomoserine (thiol)-lyase, Sulfolobus solfataricus
- NP\_786043 O-succinylhomoserine (thiol)-lyase, Lactobacillus plantarum WCFS1
- 30 NP\_719586 Shewanella oneidensis MR-1
- CAD30944 Streptomyces coelicolor A3(2)
- NP\_696324 Bifidobacterium longum NCC2705
- NP\_457953 Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi

NP\_539021 Brucella melitensis

EAA30199 O-succinylhomoserine (Thiol)-lyase, Neurospora crassa

BAC61028 Vibrio parahaemolyticus.

5 De préférence, la cystathionine- $\gamma$ -synthase modifiée telle que définie précédemment, comprend au moins une mutation dans sa partie C-terminale, et/ou au moins une mutation dans sa partie N-terminale.

Par mutation, on entend selon l'invention la substitution d'un acide aminé de la séquence native par un acide aminé différent.

10 De préférence, la mutation consiste à remplacer un acide aminé acide, lequel interagit avec le co-substrat cystéine pour l'enzyme non modifiée, par un acide aminé apolaire, sélectionné parmi les résidus glycine, alanine, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine ou méthionine.

Ces acides aminés peuvent être identifiés par référence à la structure cristalline de la cystathionine- $\gamma$ -synthases de *E. coli*, décrite par Clausen & al. (EMBOJ, Vol. 17, No. 23, pp 6827-6838, 1998).

De manière avantageuse, la mutation dans la partie C-terminale est introduite parmi les acides aminés acides de la « zone conservée 1 » telle que définie ci-dessus, en particulier au niveau du résidu X2.

20 La cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée selon l'invention comprend avantageusement la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie C-terminale :

X1-X2-X3-L-G-X4-X5-X6-X7-X8-X9

dans laquelle

25 X1, X3, X4, X5, X6, X7, X8 et X9 sont définis ci-dessus, et  
X2 représente G,A,L,I,V,F,M, de préférence A.

De manière avantageuse, la mutation dans la partie N-terminale est introduite parmi les acides aminés acides de la « zone conservée 2 » telle que définie ci-dessus, en particulier au niveau du résidu X11 et/ou R48 et/ou X13.

30 De manière préférentielle, la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée, selon l'invention comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie C-terminale :

A-A-S-L-G-G-V-E-S

La cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée selon l'invention peut comprendre avantageusement la séquence d'acide aminés suivante dans sa partie N-terminale :

X10-X11-Y-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18

5           dans laquelle  
X7, X9, X12, X14, X15, X16, X17 et X18 sont définis ci-dessus,  
X11 est défini ci-dessus ou représente un acide aminé apolaire,  
X13 est défini ci-dessus ou représente un acide aminé apolaire,  
X19 est défini ci-dessus ou représente un acide aminé apolaire, et  
10           l'un au moins de X11, X13 et X19 représente un acide aminé apolaire tel que  
défini précédemment.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « methionine synthase » modifiée est une cystathionine- $\gamma$ -synthase telle que définie précédemment, modifiée pour permettre la conversion directe de la  
15           O-succinyl-L-homosérine en L-méthionine avec le méthyl-mercaptan comme source de soufre (composé de formule générale (II) dans laquelle R représente le méthyle).

Selon un mode de réalisation préférentiel de l'invention, la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « methionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés représentée sur la SEQ ID NO 8. Une séquence d'ADN codant pour cette  
20           enzyme modifiée est représentée sur la SEQ ID NO 7.

La présente invention concerne également les cystathionine- $\gamma$ -synthases modifiées telles que définies ci-dessus ainsi que les séquences d'acide nucléique codant pour ces cystathionine- $\gamma$ -synthases modifiées, notamment les séquences  
25           isolées, en particulier les séquences d'ADN et notamment la séquence représentée sur la SEQ ID NO 7, les vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant les dites séquences, en particulier les vecteurs comprenant lesdites séquences d'acide nucléique sous le contrôle d'éléments de régulation nécessaires à l'expression et la transcription de la cystathionine- $\gamma$ -synthase modifiée dans un organisme hôte et les  
30           organismes hôtes transformés avec lesdits vecteurs.

De manière avantageuse, les acylhomosérine sulfhydrylases « initiales » ou à activité « méthionine synthase » non modifiée sont choisies parmi les acylhomosérine sulfhydrylases correspondant au PFAM référence PF01053 et au COG référence COG2873.

5 Elles sont de préférence choisies parmi les acylhomosérine sulfhydrylases suivantes :

NP\_785969 O-acetylhomoserine (thiol)-lyase, *Lactobacillus plantarum* WCFS1

AAN68137 O-acetylhomoserine sulfhydrylase, *Pseudomonas putida* KT2440

NP\_599886 O-acetylhomoserine sulfhydrylase, *Corynebacterium glutamicum* ATCC

10 13032

NP\_712243 acetylhomoserine sulfhydrylase, *Leptospira interrogans* serovar lai str.  
56601

BAC46370 O-succinylhomoserine sulfhydrylase, *Bradyrhizobium japonicum*  
USDA110

15 AAO57279 O-succinylhomoserine sulfhydrylase, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*  
str. DC3000

NP\_284520 O-succinylhomoserine sulfhydrolase [*Neisseria meningitidis* Z2491]

AAA83435 O-succinylhomoserine sulfhydrylase (*P. aeruginosa*)

20 Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la souche à activité « méthionine synthase » améliorée comprend une inactivation d'au moins un gène endogène impliqué dans la voie de biosynthèse habituelle de la méthionine.

Ceci permet de sélectionner les souches qui ont développé le métabolisme alternatif selon l'invention pour la production de méthionine. Il est à noter que l'on obtient alors des souches auxotropes pour la méthionine (e.g. *metE*), qui survivent en raison de leur possibilité à produire cet acide aminé par une voie alternative. Il peut être nécessaire, dans le test de criblage selon l'invention, que de la méthionine soit présente initialement dans le milieu de culture afin de permettre une première croissance des microorganismes.

30 Dans un mode de réalisation préféré, la souche bactérienne comprend une inactivation d'au moins un gène endogène choisi parmi *metB*, *metJ*, *metC*, *metE*, *methH*.

Une mutation du gène *metJ* a été proposée dans JP 2000157267-A/3, pour produire une quantité supérieure de méthionine (voir aussi GenBank E35587). Ce gène code pour une protéine de répression des gènes *metB*, *E*, *L*, *J* et *R* (chez *Salmonella typhimurium*). Son inactivation ou sa modification permet de diminuer le rétrocontrôle par la méthionine.

Le gène *metC* (GenBank M12858), code la cystathionine-β-lyase (EC 4.4.1.8), les gènes *metE* (GenBank AE000458) et *metH* (GenBank J04975) codent la méthionine synthase (EC 2.1.1.13). La méthionine est un acide aminé essentiel à la vie cellulaire. L'inactivation d'un ou plusieurs de ces gènes revient à supprimer la voie habituelle de biosynthèse de la méthionine.

En utilisant les références données sur GenBank pour ces gènes qui sont bien connus, l'homme du métier est capable de déterminer les gènes équivalents dans d'autres souches bactériennes qu'*E. coli*. Ce travail de routine est avantageusement effectué en utilisant les séquences consensus pouvant être déterminées du fait de la synthèse de ces gènes pour d'autres microorganismes, et en dessinant des sondes dégénérées permettant de cloner le gène correspondant dans un autre organisme. Ces techniques de routine de biologie moléculaire sont bien connues dans l'art et sont décrites par exemple dans Sambrook et al. (1989 Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.).

La souche à activité « méthionine synthase » modifiée selon l'invention comprenant une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée définie ci-dessus comprend de préférence au moins une inactivation du gène *metE* et/ou *metH*, et/ou du gène *metC*, et/ou du gène *metB*.

Lorsque l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée définie ci-dessus permet d'effectuer la conversion directe du substrat de formule générale (III) en acide de formule générale (I), la souche selon l'invention comprend avantageusement au moins une inactivation du gène *metE* et/ou *metH* et/ou *metB*, de préférence au moins une inactivation du gène *metE*.

Lorsque l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée définie ci-dessus permet d'effectuer la conversion du substrat de formule générale (III) en homocystéine de formule générale (IV)



laquelle est ensuite transformée en acide de formule générale (I) par une enzyme appropriée, la souche selon l'invention comprend au moins une inactivation du gène *metC* et/ou *metB*. Elle peut également comprendre une inactivation du gène *metE* et/ou *metH* endogène. Dans ce cas, l'activité méthylase associée aux gènes 5 *metE* et/ou *metH* est restaurée par l'introduction d'un gène codant pour une enzyme ayant la même activité. Cette enzyme peut avoir été sélectionnée et/ou modifiée pour permettre une amélioration des rendements de synthèse des acides aminés de formule générale (I).

10 Dans un mode de réalisation, ladite souche bactérienne peut comprendre également une modification de l'activité homosérine O-acyltransférase porté par le gène *metA* afin de lui conférer au choix une activité homosérine O-succinyltransférase (EC 2.3.1.46) ou homosérine O-acétyltransférase (EC 2.3.1.11).

15 Dans un mode particulier, on pourra remplacer ou modifier le gène *metA* de *E. coli*, codant l'enzyme possédant l'activité homosérine O-succinyltransférase (Genbank AAN83396), afin d'obtenir une activité homosérine O-acétyltransférase. Il est connu de l'homme du métier que cette activité est codée par le gène *metA* de *C. glutamicum* (Genbank AF052652). Les protocoles permettant de remplacer le gène 20 *metA* de *E. coli* par le gène *metA* de *C. glutamicum*, ou de modifier la séquence de *metA* de *E. coli* afin d'obtenir une activité homosérine O-acetyltransferase au lieu d'une activité homosérine O-succinyltransférase sont connus de l'homme du métier.

De manière similaire on peut remplacer ou modifier le gène *metA* de *C. glutamicum*, codant une activité homosérine O-acetyltransférase, afin d'obtenir une activité homosérine O-succinyltransférase.

25

Toutes les modifications mentionnées ci-dessus peuvent être effectuées directement sur la souche objet de la pression de sélection, lorsque le procédé selon l'invention est mis en œuvre. Alternativement, il est préférable de mettre en œuvre le procédé de criblage selon l'invention sur une souche ne présentant qu'un nombre 30 restreint de modifications, d'obtenir une souche présentant une activité « méthionine synthase » en présence du composé de formule (II), en particulier de méthyl-mercaptan, et d'effectuer alors d'autres modifications telles que mentionnées, afin d'augmenter le 'bypass' de la voie classique de synthèse de la méthionine.

L'homme du métier connaît les protocoles permettant de modifier le caractère génétique de microorganismes. La surexpression d'un gène peut être effectuée par changement du promoteur de ce gène *in situ*, par un promoteur fort ou inducible. De façon alternative, on introduit, dans la cellule, un plasmide répliquatif (simple ou 5 multicopies) dans lequel le gène que l'on désire surexprimer est sous le contrôle du promoteur adéquat.

L'inactivation d'un gène se fait préférentiellement par recombinaison homologue. Le principe d'un protocole en est rappelé brièvement : on introduit dans la cellule un fragment linéaire, obtenu *in vitro*, comprenant les deux régions flanquant 10 le gène, et au moins un gène de sélection entre ces deux régions (généralement un gène de résistance à un antibiotique), ledit fragment linéaire présentant donc un gène inactivé. On sélectionne les cellules ayant subi un événement de recombinaison et ayant intégré le fragment introduit par étalement sur milieu sélectif. On sélectionne ensuite 15 les cellules ayant subi un événement de double recombinaison, dans lesquelles le gène natif a été remplacé par le gène inactivé. Ce protocole peut être amélioré en utilisant des systèmes de sélections positive et négative, afin d'accélérer la détection des événements de double recombinaison.

Dans un mode de réalisation préféré, ladite souche bactérienne est une souche 20 d'*E. coli*.

Dans un autre mode de réalisation, ladite souche bactérienne est une souche de *Corynebacterium*, en particulier *C. glutamicum*.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la souche bactérienne est la souche *E. coli* K183, déposée à la CNCM le 2 avril 2003 sous le numéro I-3005. Cette souche comprend un gène exprimant une cystathionine-γ-synthase 25 modifiée, l'enzyme comprenant la mutation E325A, décrite précédemment et une inactivation du gène metE.

Les souches de microorganismes selon l'invention possèdent une enzyme cystathionine-γ-synthase et/ou l'acylhomosérine sulfhydrylase ; elles sont de 30 préférence sélectionnées et améliorées par un procédé de criblage et d'évolution, qui est aussi un objet de l'invention. Les souches selon l'invention peuvent également être génétiquement modifiées (c'est-à-dire présenter une inactivation, une mutation

et/ou la suractivation d'au moins un gène endogène), la modification étant effectuée préalablement ou non à la mise en œuvre du procédé de criblage.

Afin d'accélérer la sélection et l'évolution dirigée des souches pour la production de méthionine en présence de composé de formule (II), en particulier de méthyl-mercaptopan, on peut effectuer les opérations ci-dessous. Le procédé est décrit pour le méthyl-mercaptopan. Toutefois, l'homme du métier saura l'adapter avec tout autre composé de formule (II), en particulier l'H<sub>2</sub>S.

a. Coupler la biosynthèse de la molécule d'intérêt à la croissance du microorganisme de telle sorte que la production de cette molécule est nécessaire pour une bonne croissance du microorganisme

Pour cette raison on peut faire le choix de détruire le gène *metE* codant la méthionine-synthase qui produit la méthionine à partir d'homocystéine. Ce faisant la souche devient auxotrophe pour la méthionine.

Le microorganisme, pour vivre en milieu minimum contenant une source de carbone simple et du méthylmercaptopan ou méthylmercaptide de sodium, doit donc optimiser la voie de synthèse de la L-méthionine à partir de l'O-acyl-L-homosérine et du méthylmercaptopan ou méthylmercaptide de sodium. Une modélisation informatique montre que dans ces conditions il est possible de doubler les rendements théoriques en méthionine (Tableau 1).

Rendements biomasse $Y_{XS} (g.g^{-1})$	Rendements méthionine <sup>a</sup> $Y_{PS} (g.g^{-1})$	Rendements méthionine <sup>b</sup> $Y_{PS} (g.g^{-1})$
0	0,36	0,74
0,11	0,30	0,62
0,28	0,21	0,42
0,44	0,12	0,24
0,61	0	0

Tableau 1 : rendements théoriques maximums pour la production de méthionine (g de produit/g de glucose) par *E. coli* dans le cas d'une fermentation sur glucose (a) et d'une fermentation sur glucose et méthyl-mercaptopan (b) avec un rendement en biomasse constant (cultures continues).

Cependant, lorsque l'on souhaite produire un acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique différent de la L-méthionine, il est nécessaire de supplémenter le milieu en méthionine pour permettre la croissance du microorganisme.

b. Supprimer les régulations, notamment les rétro-inhibitions soit au niveau des enzymes, soit au niveau des gènes afin que la voie de biosynthèse principale soit potentialisée

On peut ainsi supprimer le gène *metJ* codant une protéine répresseur. Par 5 ailleurs, il a été montré que l'homosérine trans-succinylase, codée par le gène *metA*, était rétro-inhibée par la méthionine et la S-adénosylméthionine (Taylor et al., 1966, J. Biol. Chem., 241 : 3641-3642). Il est donc souhaitable de remplacer cette enzyme par une enzyme insensible à la rétro-inhibition (Chater et al, 1970, J. Gen. Microbiol. 63: 121-131).

10

Un autre objet de l'invention est un test de criblage-identification permettant d'obtenir 15 un microorganisme produisant de l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique, notamment la L-méthionine, en métabolisant un composé soufré de formule générale (II), en particulier un alkyl-mercaptan ou l'H<sub>2</sub>S, notamment le méthyl-mercaptan.

Ainsi, la présente invention permet d'identifier des souches présentant des mutations dans leur génome, lesdites mutations permettant l'assimilation du composé de formule (II) par ladite souche, et la production dudit acide aminé de formule (I). Lesdites modifications induisent donc une modification/augmentation de l'activité « méthionine synthase » de ladite souche. On peut alors accélérer la production de la souche produisant de la méthionine de façon autonome à partir d'une source de carbone simple et de composé de formule (II).

Un autre objet de l'invention est donc un procédé de criblage d'une souche bactérienne initiale, éventuellement génétiquement modifiée, possédant un gène 20 codant pour une enzyme cystathionine-γ-synthase ou acylhomosérine sulphydrylase, en vue d'obtenir une souche bactérienne génétiquement modifiée produisant un acide aminé de formule (I), en particulier de la L-méthionine, et présentant une modification dans le gène de ladite enzyme, induisant une modification de l'activité « méthionine synthase » en présence d'un composé soufré de formule (II), présentant 25 l'étape consistant à soumettre ladite souche bactérienne à une pression de sélection en présence du composé de formule (II), afin de diriger une évolution du gène codant pour ladite enzyme cystathionine-γ-synthase ou acylhomosérine sulphydrylase, dans 30 ladite souche bactérienne, ladite évolution consistant en une mutation pour leur

permettre de réaliser de manière préférentielle la conversion directe du substrat de formule générale (III) en acide aminé de formule générale (I) ou en homocystéine de formule générale (IV).

5 Ladite souche bactérienne initiale présente éventuellement une inactivation et/ou une suractivation, notamment par insertion d'un promoteur fort constitutif, d'au moins un gène endogène.

10 L'invention se rapporte également à une souche bactérienne présentant une modification dans le gène de l'enzyme cystathionine- $\gamma$ -synthase et/ou dans le gène de l'enzyme acylhomosérine sulfhydrylase, induisant une augmentation de l'activité « méthionine synthase » de ladite de ladite enzyme en présence du composé de formule (II), en particulier de méthyl-mercaptan. Une telle souche peut également présenter au moins une autre modification génétique, (inactivation, mutation ou surexpression d'un gène endogène), telle que mentionnée ci-dessus.

15 La souche selon l'invention est de préférence susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'invention, et en particulier est obtenue par le procédé selon l'invention.

20 L'invention se rapporte également à un procédé de préparation d'un acide 2-amino-4(alkylmercapto)butyrique de formule (I) définie ci-dessus, dans lequel on cultive un microorganisme à activité « méthionine synthase » modifiée telle que défini précédemment, en présence d'un composé soufré de formule générale (II) dans un milieu approprié, ledit milieu approprié comprenant une source de carbone simple telle que définie précédemment. De préférence, ledit acide aminé de formule (I) est la méthionine, plus préférentiellement L-méthionine, et ledit composé soufré de formule (II) est le méthyl-mercaptan ou l'H<sub>2</sub>S.

25 Selon l'invention, les termes « culture » et « fermentation » sont employés indifféremment pour désigner la croissance de la bactérie sur un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple.

30 La définition des conditions de culture des microorganismes selon l'invention (fermentation) est à la portée de l'homme du métier. On fermente notamment les bactéries à une température comprise entre 20°C et 55°C, de préférence entre 25°C et

40°C, plus particulièrement d'environ 30°C pour *C. glutamicum* et d'environ 37°C pour *E. coli*.

La fermentation est généralement conduite en fermentateurs avec un milieu minéral de culture de composition connu défini et adapté en fonction des bactéries utilisées, contenant au moins une source de carbone simple ainsi que du composé soufré de formule (III).

En particulier, le milieu minéral de culture pour *E. coli* pourra ainsi être de composition identique ou similaire à un milieu M9 (Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32:120-128), un milieu M63 (Miller, 1992 ; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) ou un milieu tel que défini par Schaefer *et al.* (1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-96).

De manière analogue, le milieu minéral de culture pour *C. glutamicum* pourra ainsi être de composition identique ou similaire au milieu BMCG (Liebl et al., 1989, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 205-210) à un milieu tel que défini par Riedel et al. (2001, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 573-583).

Les milieux peuvent être supplémentés pour compenser les auxotrophies ; ils contiennent une concentration en carbone simple adaptée en fonction du mode de culture et de production, ainsi que du composé soufré de formule (II) en concentration adaptée en fonction de l'évolution de la souche et du mode de production retenu.

Après fermentation, l'acide aminé de formule (I) est récupéré selon les méthodes usuelles, et le cas échéant, purifié.

25 Les techniques de récupération puis de purification des acides aminés de  
formule (I) dans les milieux de culture sont bien connues de l'homme du métier.

La présente invention concerne également un procédé de préparation d'un acide 2-amino-4(alkylmercaptopro)butyrique de formule (I) défini précédemment, dans lequel on fait réagir substrat dérivé de formule générale (III)

$$R''\text{-O-(CH}_2)_2\text{-CHNH}_2\text{-COOH (III)}$$

dans laquelle R" représente un radical acyle, de préférence choisi parmi le radical succinyle ou le radical acétyle,

avec une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée telle que définie précédemment, dans un milieu réactionnel approprié comprenant un composé soufré de formule générale (II) défini précédemment.

Le milieu réactionnel approprié est un milieu usuel de réaction enzymatique, 5 bien connu de l'homme du métier, en particulier un milieu aqueux dans lequel les substrats et l'enzyme sont en solution ou en suspension. Les conditions de mise en œuvre de la réaction sont bien connues de l'homme du métier, afin notamment d'éviter une dénaturation substantielle de l'enzyme.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, l'enzyme à activité 10 « méthionine synthase » modifiée est présente dans une bactérie inactivée ou dans un extrait cellulaire.

Selon un autre mode particulier de réalisation de l'invention, l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est une enzyme purifiée.

15

#### DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : synthèse de la méthionine à partir de l'homosérine, chez les bactéries.

Figure 2 : Schéma de synthèse de la méthionine selon l'invention appliquée dans *E. coli* ; une stratégie équivalente est transposable chez de nombreux microorganismes dont *C. glutamicum*. Les stratégies *metB\** ou *metY\*\** nécessitent l'utilisation d'une 20 souche initialement au moins  $\Delta(\text{metE})$  tandis que les stratégies *metB\*\** ou *metY\** nécessitent l'utilisation d'une souche initialement au moins  $\Delta(\text{metC})$ .

Légende :

MetA : homosérine succinyltransferase ; pourra être remplacé par une isoforme insensible à la rétro-inhibition par la méthionine ou par une isoforme 25 homoserine acetyltransferase éventuellement insensible à la rétro-inhibition par la méthionine.

MetB : cystathionine  $\gamma$ -synthase

MetB\* : cystathionine  $\gamma$ -synthase évoluée en « méthionine synthase »

MetB\*\* : cystathionine  $\gamma$ -synthase évoluée en homocysteine synthase

30 MetY\* : O-acetyl-homosérine (de *C. glutamicum*) évoluée en homocysteine synthase

MetY\*\* : O-acetyl-homosérine (de *C. glutamicum*) évoluée en « méthionine synthase »

La voie centrale représente la voie naturelle de synthèse de la méthionine chez *E. coli*. Les autres voies indiquées correspondent aux procédés selon l'invention.

- 5 Figure 3 : représentation d'un mécanisme de fermentation continue pour la sélection dirigée des souches selon l'invention. Nous utilisons par exemple la technologie « Fedbacth-Pro » de la société DASGIP. Il s'agit d'un système modulaire contrôlé par ordinateur permettant la fermentation en parallèle de microorganismes en ayant un control de l'alimentation en milieu, en pH et pO<sub>2</sub>.
- 10 Figure 4 : Comparaison de spectres de <sup>13</sup>C-RMN, correspondant au carbone 5 de la méthionine, obtenus par HSQC sur un hydrolysat de la souche sauvage (haut) ou de la souche K1a-F optimisée (bas). On observe que le carbone 5 de la souche K1a-F n'est pas marqué au carbone 13 ce qui confirme qu'il provient du méthylmercaptide de sodium
- 15 Figure 5 : Alignement de séquences non modifiées de cystathionine-γ-synthases. Alignement réalisé avec l'algorithme MULTALIN  
[\(<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>\)](http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl)
- Figure 6 : Alignement de séquences non modifiées de acylhomosérine sulfhydrylases. Alignement réalisé avec l'algorithme MULTALIN.
- 20 Figure 7 : Cinétique de croissance de la population *E. coli* Δ(metC) lors de son ensemencement initial (culture N°1) et lors de son dixième repiquage (Repicage 10).

## EXEMPLES

### Exemple 1 : Construction de la souche Δ(metE)

25 L'inactivation du gène *metE* est réalisée en insérant une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en déletant la majeure partie du gène concerné. La technique utilisée est décrite par Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 6640-6645.

- 30 Deux oligonucléotides sont utilisés pour réaliser la stratégie:
- DmetER de 100 bases (SEQ ID NO 9):
    - .....taccccccacgcaagttctgcgcgcctgcaccatgtcgccagtgccgcgggtttctggccaggccgcgcg  
tttcagCATATGAATATCCTCCTTAG

avec :

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (4012903 à 4012824) du gène *metE* (séquence 4010643 à 4012904, séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)

5 une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol du plasmide pKD3 (Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 6640-6645)

- DmetEF de 100 bases (SEQ ID NO 10):

10 tgacaatattgaatcacaccctcggttccctcgcggtggcctgcgtcgagctgaaaaaaagcgcaagaaagt  
attggTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

avec :

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (4010644 à 4010723) du gène *metE*

15 une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol portée par le plasmide pKD3

Les oligonucléotides DmetER et DmetEF sont utilisés pour amplifier la cassette de résistance au chloramphénicol à partir du plasmide pKD3. Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinase exprimée permet la recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides metER et metEF.

MetER (SEQ ID NO 11) : ggtaaggcgtatggggaaagaagtcgc (homologue à la séquence de 4012978 à 4012949)

MetEF (SEQ ID NO 12) : cccggggatgaataactlgccgcctccc (homologue à la séquence de 4010567 à 4010596)

La cassette de résistance au chloramphénicol peut ensuite être éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment.

**Exemple 2 : Modification de la souche  $\Delta(\text{metE})$  pour la production de méthionine à partir de méthyl-mercaptopan**

Pour optimiser *E. coli* pour la production de méthionine à partir du méthyl-mercaptopan, on effectue une sélection dirigée en flacons.

La souche *E. coli*K12 est préalablement rendue auxotrophe pour la méthionine en inactivant le gène *metE*, préparée selon les conditions de l'exemple 1 ne peut donc croître qu'en fabriquant sa propre méthionine, par l'utilisation du méthyl-mercaptopan.

La mise en œuvre de cette technique permet la sélection d'une souche de *Escherichia coli* dont la cystathionine- $\gamma$ -synthase (EC 4.2.99.9) a développé une activité « méthionine-synthase » modifiée en présence de méthyl-mercaptopan.

La sélection dirigée est conduite en flacon en verre hermétiquement fermé contenant 50 mL de milieu minéral (Schaefer et al., 1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-96) en présence de 33 mM glucose, et du chloramphénicol à une concentration finale de 25 mg/l.

Les milieux de culture sont ensemencés avec la souche *E. coli* K12  $\Delta\text{metE}$  à  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  définie. On ensemence avec une population de bactéries suffisamment importante pour que certaines bactéries possèdent potentiellement des mutations spontanées intéressantes dans le gène *metB*, permettant d'assimiler le méthyl-mercaptopan. Cette population a été obtenue par culture de la souche auxotrophe en méthionine sur milieu minimum supplémenté en méthionine.

Trois flacons reçoivent alors 100  $\mu\text{L}$  d'une solution à 400 mg/L de sodium mercaptide, tandis qu'un quatrième flacon ne reçoit pas de sodium mercaptide. Les cultures sont réalisées sous agitation, à 37°C, pendant 6 jours, puis la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  est mesurée. Les résultats sont résumés dans le tableau N°3.

Tableau 3. Mesure de la densité optique de milieux de cultures pour *E. coli* en présence (flacons 1-3) ou absence (flacon témoin) de sodium mercaptide.

	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon Témoin
$\text{DO}_{600\text{nm}}$ à $T=0$	0.34	0.34	0.34	0.34
$\text{DO}_{600\text{nm}}$ à $T=6$ jours	0.23	1.14	0.79	0.32

Ces résultats montrent que les flacons 2 et 3 ont permis de multiplier une souche capable d'utiliser le méthyl-mercaptopan pour produire la méthionine nécessaire à sa croissance (augmentation de la densité optique).

L'activité « méthionine synthase » améliorée observée provient d'une 5 modification dans le gène de la cystathionine  $\gamma$ -synthase de la souche *E. coli* K12  $\Delta metE$ , contenue dans les flacons 2 et 3.

La population bactérienne du Flacon 2 peut alors être utilisée pour améliorer davantage l'activité « méthionine synthase » en présence de méthyl-mercaptopan, en utilisant un procédé de criblage et amélioration par fermentation en étage, ou en 10 recommençant le procédé en flacon tel qu'il vient d'être décrit.

### Exemple 3 : Criblage et amélioration par fermentation en étage

Pour optimiser *E. coli* pour la production de méthionine à partir du méthyl-mercaptopan, on effectue une sélection.

15 La mise en œuvre de cette technique permet la sélection d'une souche de *Escherichia coli* dont la cystathionine- $\gamma$ -synthase (EC 4.2.99.9) a développé une activité « méthionine-synthase » améliorée en présence de méthyl-mercaptopan.

Alternativement, on peut utiliser une souche obtenue selon l'exemple 2.

La sélection dirigée est conduite dans un système en continu en étage (Figure 20 3).

Le premier fermenteur produit les bactéries à une vitesse proche du taux de croissance maximum. Les bactéries passent en continu de ce fermenteur dans un second fermenteur caractérisé par un taux de dilution plus faible et un milieu avec le crible de sélection (ici, le méthyl-mercaptopan).

25 La pression de sélection, imposée à la bactérie dans le second fermenteur, est établie par la concentration en méthyl-mercaptopan. Des cycles successifs de sélection permettent d'appliquer aux bactéries des cibles de plus en plus fort par des concentrations croissantes en méthyl-mercaptopan.

30 Pour chaque concentration, la souche sélectionnée dans le second fermenteur est celle qui a évolué pour métaboliser la totalité du méthyl-mercaptopan (méthyl-mercaptopan résiduel nul dans le fermenteur).

Dans ce cas, on recommence la sélection en utilisant le fermenteur n°2 comme fermenteur de croissance et le fermenteur n°1 comme fermenteur de cible, présentant du méthyl-mercaptopan de concentration plus forte qu'à l'étape précédente.

On effectue différents cycles de sélection pour obtenir une souche fermentant  
5 le méthyl-mercaptopan avec une vitesse élevée. L'analyse de cette souche permet de définir les mutations dans le gène de la cystathionine- $\gamma$ -synthase.

Exemple 4 :

La population d'*E. coli* K12  $\Delta$ metE issue du flacon 2 de l'exemple 2 a subi des  
10 repiquages successifs en flacon. La nouvelle population obtenue K1a-F est mise en culture dans un milieu minimum (Schaefer *et al.*, 1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-96) contenant 2,5 g.l<sup>-1</sup> de glucose entièrement marqué au carbone 13 et du méthylmercaptide de sodium (200 ppm) non enrichi en carbone 13. Cette population est auxotrophe pour la méthionine en l'absence de méthylmercaptide de sodium.

15 Après la culture, les cellules sont récupérées, lavées puis hydrolysées par HCl 6N pendant 24 heures à 107°C. Une analyse par RMN bidimensionnelle est alors réalisée (HSQC). Cette analyse permet d'étudier le carbone 5 de la méthionine, qui provient, soit de la L-cystéine, produite à partir du glucose présent dans la solution (voie classique), soit du méthylmercaptide de sodium lorsque la nouvelle voie  
20 métabolique selon l'invention est utilisée.

L'expérience est conduite de manière similaire avec la souche sauvage *E. coli* K12 (produisant la méthionine à partir du glucose), en absence de méthylmercaptide de sodium.

La figure 4 montre deux spectres 1D, issus de deux acquisitions distinctes, superposés pour une meilleure lecture. Ces spectres 1D sont extraits de spectres RMN à deux dimension type HSQC (corrélation entre protons et carbone 13). Les spectres RMN à deux dimensions ont été obtenus sur un hydrolysat acide des bactéries.

30 L'échantillon analysé est un hydrolysat total ; cependant du fait de la sensibilité de la RMN et des temps d'acquisition utilisés, on détecte essentiellement les acides aminés, les sucres, les bases et le glycérol. Chaque carbone (couplé à un proton) de chaque acide aminé donne une résonance magnétique nucléaire.

Le carbone 5 de la méthionine (c'est à dire le groupe méthyl terminal) présente un déplacement chimique d'environ 14,7 ppm. La figure 4 présente la zone de déplacement chimique centrée autour de 14,7 ppm pour les deux souches.

On remarque que dans le cas du spectre supérieur, le signal du carbone 5 est fort, indiquant que le carbone 5 est marqué au carbone 13. En conséquence, ce carbone 5 provient du glucose marqué introduit comme substrat dans le milieu de culture.

On remarque par contre que le même signal est très faible dans le spectre inférieur (souche K1a-F). Cela signifie que le carbone 5 n'est pratiquement pas marqué. Pourtant les autres carbones de la molécule sont fortement marqués (résultats non présentés). Le carbone 5 non marqué ne provient donc pas du glucose mais du méthyl-mercaptan.

On peut donc conclure que la souche K1a-F produit de la méthionine à partir de succinyl-L-homosérine et de méthylmercaptide de sodium.

15

#### Exemple 5 :

La population K1a-F subit 14 nouveaux cycles de repiquage successifs en flacon. On obtient ainsi la population K144 que l'on étale alors sur milieu minimum gélosé contenant du glucose pour seule source de carbone. Les boites inoculées sont placées en condition aerobie dans une jarre anaérobie dans laquelle est introduit un tube contenant du méthylmercaptide de sodium dissout dans de l'eau, la jarre est alors placée dans un incubateur à 37°C. La température d'ébullition du methylmercaptide de sodium étant de 5°C, l'atmosphère de la jarre anaérobie s'enrichie en methylmercaptan. Après 4 jours, les clones apparaissent sur les boites ; ils correspondent aux bactéries capables de produire de la méthionine en présence de méthylmercaptan. Dix clones sont isolés, dont le clone K176. Le clone K176 est multiplié en culture liquide et des stocks glycérols sont réalisés portant le numéro K183.

Le clone K183 est envoyé au séquençage en même temps que la souche E. coli K12 Δ(*metE*) initiale. Pour chaque clone la séquence des gènes *metJ* et *metB* (SEQ ID N°7) est déterminée. La séquence obtenue pour *metB* permet d'observer la présence d'une alanine en position 325 (SEQ ID N°8) en remplacement d'un

glutamate (SEQ ID N°6). Le gène *metJ* ne présente aucune mutation. Cette souche a été déposé à la CNCM le 2 avril 2003, sous le numéro I-3005.

Exemple 6 :

5 Le clone K183 est cultivé en flacon, en milieu minimum avec glucose et méthylmercaptide de sodium pour seule source de carbone. En parallèle, une culture est réalisée dans des conditions identiques avec la souche *E. coli* K12 sauvage. On observe que la consommation de glucose par g de biomasse est deux fois plus importante que pour une souche de *E. coli* sauvage. La surconsommation est  
10 probablement due en partie à la production d'acétate.

Souches	Rendement Biomasse	Rendement Acétate
MBM01	0.45	<0.002
K183	0.24	0.36

Comparaison du rendement de biomasse entre la souche *E. coli* sauvage et le clone évolué K183 :

Rendement Biomasse exprimé en g(biomasse)/g(glucose).

15 Rendement Acétate exprimé en g(acétate)/g(glucose).

L'analyse des métabolites intracellulaires et extracellulaire de ces deux cultures montre notamment :

En intracellulaire, une augmentation de lalanine, du pyruvate, du ketobutyrate et de 2 ketoisocaproate et une diminution de la concentration en  
20 tryptophane, norvaline, norleucine, leucine et méthionine.

En extracellulaire, une accumulation de glutamate, d'isoleucine, thréonine, valine et 2-ketoisocaproate et une diminution de pyruvate, norleucine, tryptophane.

Exemple 7 : Caractérisation de l'activité spécifique « méthionine synthase » des souches MBM01 et K183 en présence de méthylmercaptan.

Afin de montrer l'amélioration de l'activité méthionine synthase dans la souche K183 par rapport à la souche sauvage (MBM01), des réactions enzymatiques sont réalisées en utilisant des extraits acellulaires préparés à partir de cultures des souches K183 et MBM01 réalisées sur riche (milieu BH1, commercialisé par DIFCO).

avec 2,5 g/L de glucose) en absence de méthylmercaptopan. Les extraits protéiques sont désalés sur PD10 et réservés sur glace.

#### **Conditions réactionnelles et traitement de l'échantillon**

- Préparer sur la glace une solution de sodium methanethiolate diluée 10 fois (100 µl de solution 3M plus 900 µl d'eau mQ)
- 5 - Préparer sur la glace les mélanges réactionnels constitué de 20µL de tampon phosphate 500 mM pH 6.5, 10µl Pyridoxal phosphate 2,5 mM, 16 µL O-succinylhomosérine 25 mM, 10 µL Sodium methanethiolate 0,3 M, 24 µL eau milliQ.
- 10 - placer les tubes à 37°C (thermomixé sous la hotte) et ajouter l'extrait protéique (20 µl) pour démarrer la réaction.
- Pour arrêter la réaction (0 à 30 minutes), placer les tubes sur glace et ajouter 400 µl d'acétone à -20°C.
- placer les tubes à -20°C pendant 30 minutes
- 15 - puis ouvrir les tubes sous la hotte pendant 10 minutes pour évaporer le méthane-thiol et l'acétone (les maintenir sur glace)
- centrifuger 5 minutes à 10000 g (petite centri), transvaser le surnageant (~100 µL) dans des tubes éppendorf et diluer pour un volume final de 1 mL.

#### **Mesure de l'activité méthionine synthase en détectant la quantité de succinate libéré du succinylhomosérine :**

- Dix µl de l'échantillon ci-dessus obtenu sont analysés par chromatographie ionique en utilisant un Appareil Dionex DX-500 équipé d'une précolonnes AG-11 2 mm et d'une colonne AS-11 2 mm, d'un suppresseur ASRS Ultra, d'une boucle injection 10 µl. Un gradient est alors appliqué : 0 – 7 min 0,5 mM KOH ; 7 min injection ; 7 – 9,5 min 0,5 mM KOH ; 9,5 – 13 min 0,5 – 5 mM KOH ; 13 – 25 min 5 – 38,3 mM KOH.

#### **Mesure de l'activité méthionine synthase en détectant la quantité de methionine synthétisée en présence de methylmercaptopan**

L'analyse est réalisée par GC-MS ce qui nécessite de silyler les échantillons préalablement à l'injection. Pour cela chaque échantillon reçoit un standard interne (serine<sup>13</sup>C) qui permet de valider la qualité de la silylation. Les échantillons sont ensuite lyophilisés pendant la nuit.

La dérivation est réalisée en appliquant le protocole suivant :

Ajouter 400 µl de la solution d'hydroxylamine (0,250g +/- 0,002 g dissous dans 10 ml de Pyridine) à l'aide d'une pipette automatique de 1 ml et fermer correctement les tubes. Mélanger à l'aide d'un Vortex pendant 2 fois 10 secondes. Concentrer le milieu réactionnel au fond du tube par centrifugation (maxi 1 minute à 5 5000 g) et laisser réagir 1 heure 30 à 30°C. Ouvrir les tubes et ajouter 1000 µl de solution de BSTFA à l'aide d'une pipette automatique de 1 ml et compléter avec 100µl de Pyridine (pipette automatique de 200 µl). Refermer les tubes, vortexer pendant 10 secondes et mettre à incuber respectivement pendant 60 minutes à 60°C dans le cas des dérivés TBDMS et 30 minutes à 70°C pour le BSTFA. Si nécessaire 10 filtrer les échantillons sur filtre à usage unique avec membrane PTFE de 0,22 µm ou centrifuger à 5000 g pendant 5 minutes. Transférer dans un flacon de 1,5 ml, sertir et injecter en CPG.

Les analyses ont été réalisées avec l'appareil Agilent technologies GC6890/MSD5973 équipé d'une colonne apolaire (HP-5MS, Bios Analytique). Le 15 gaz vecteur est l'hélium à débit constant de 1 ml.min<sup>-1</sup>. L'injection de 1 µl d'échantillon a lieu en mode splitless avec un débit de purge de 50 ml.min<sup>-1</sup> pendant 0,85 min. Le profil de température est le suivant : la température initiale de 90°C est maintenue pendant 2 minutes puis augmente jusqu'à 320 °C avec une pente de 10 °C.min<sup>-1</sup>. Cette température est maintenue pendant 6 minutes. La détection se fait par 20 spectrométrie de masse avec ionisation par impact électronique en mode balayage dans une gamme variant de m/z = 40 à 550 amu. Le délai de passage de solvant est réglé à 3,10 minutes.

### Résultats

Dans ces conditions, une activité « méthionine synthase » a pu être dosée dans 25 les échantillons incubés avec le méthanethiol, via la quantification d'une part, du succinate par chromatographie ionique et d'autre part, de la méthionine par GC-MS.

<b>Souche</b>	<b>Culture</b>	<b>Extrait protéique</b>	<b>Concentration en protéines</b>	<b>Activité spécifique (mUI/mg protéines)</b>	
				<b>Dosage Succinate</b>	<b>Dosage Méthionine</b>
<b>MBM01</b>	<b>FB 137/P2</b>	<b>Z63</b>	<b>3,43</b>	<b>0,30</b>	<b>0,23</b>
<b>K183</b>	<b>FB 140/P2</b>	<b>Z64</b>	<b>3,62</b>	<b>1,40</b>	<b>1,72</b>

On observe donc que l'activité méthionine synthase en présence de methylmercaptop est renforcée dans la souche évoluée par rapport à la souche sauvage confirmant que la cystathionine  $\gamma$ -synthase mutée (E325A) a une activité méthionine synthase modifiée.

**Exemple 8 : Construction de la souche  $\Delta(metC, metJB)$  puis sélection d'un gène *metY* évolué.**

10 **Construction des souches MG1655 ( $\Delta metC::Cm$ ) et MG1655 ( $\Delta metC$ )**

Pour inactiver le gène *metC* la stratégie de recombinaison homologue décrite par Datsenko & Wanner (2000) est utilisée. Cette stratégie permet l'insertion d'une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en déletant la majeure partie du gène concerné. Pour cela, nous avons utilisé deux oligonucléotides :

15 **Pour *metC* :**

- DmetCR de 100 bases (SEQ ID NO 13):

ccggcggtccagatcggcaatcagatgtcgacatcttccagaccaatatgcaggcgaatcaaggcccgtaa  
aatcgatCATATGAATATCCTCCTTAG

avec

20 une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (3151419 à 3151359) du gène *metC* (séquence 3150251 à 3151438, séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol (séquence de référence dans la publication Datsenko,

25 K.A. et Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97 : 6640-6645)

- DmetCF de 100 bases (SEQ ID NO 14) :

cggacaaaaagcttgatactcaactggtaatgcaggacgcagaaaaatacactctcgccgcggtaatag  
cgtgattTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

avec

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (3150255 à 3150334) du gène *metC*

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol.

5 Les oligonucléotides DmetCR et DmetCF sont utilisés pour amplifier la cassette de résistance au chloramphénicol à partir du plasmide pKD3. Le produit PCR obtenu est ensuite introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinase exprimée permet la recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et 10 l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides metCR et metCF. La souche retenue est nommée MG1655 ( $\Delta$ *metC::Cm*).

MetCR (SEQ ID NO 15) : cgtccgggacgccttgatcccgaggacaaac (homologue à la séquence de 3151522 à 3151493)

15 MetCF (SEQ ID NO 16) : gcgtttacgcagtaaaaaagtaccaccacgc (homologue à la séquence de 3150118 à 3150149)

La cassette de résistance au chloramphénicol peut ensuite être éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches 20 recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment. La souche retenue est nommée MG1655 ( $\Delta$ *metC*).

#### Construction de la souche MG1655 ( $\Delta$ *metB-ΔmetJ*)

25 Pour déléter les gènes *metB* et *metJ*, nous avons inséré une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en déletant la majeure partie des gènes concernés. Pour cela, nous avons utilisé deux oligonucléotides.

Pour *metBJ* :

- MetJR de 30 bases (SEQ ID NO 18):

30 ggtacagaaaaccagcaggctgaggatcagc

homologue à la séquence (4125431 à 4125460) en aval du gène *metJ* (séquence 4125975 à 4125581, séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)

- DmetJBF de 100 bases (SEQ ID NO 17) :

tatgcagctgacgaccttcgcccctgcgtgcgaatcacactcatttacccttggttgcagccggaaaggcat  
ttcaggcaccagagtaaacatt

avec

5       une partie homologue (caractères majuscule) à la séquence (4126217 à 4126197) entre les gènes *metJ* et *metB* (séquence 4126252 à 4127412) contenant la région promotrice de l'opéron *metBLF*.

10      une partie homologue (caractères minuscule) à la séquence (4127460 à 4127380) correspondant au début du gène *metL* (séquence 4127415 à 4129847) et à 10 la fin du gène *metB*.

Ces deux oligonucléotides ont été utilisés pour amplifier la région concernée sur l'ADN chromosomique de MG1655 ( $\Delta metJ :: Cm$ ) (figure 8).

15      Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinase exprimée permet la recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et la délétion de gène *metB* par recombinaison homologue est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides MetJR et MetLR.

MetJR (SEQ ID NO 18) : ggtacagaaaccaggcaggctgaggatcgc (homologue à la séquence 4125431 à 4125460)

20      MetLR (SEQ ID NO 19) : aaataacacttcacatcagccagactactgccaccaaatt (homologue à la séquence de 4127500 à 4127460)

L'événement de recombinaison homologue peut avoir lieu à deux endroits (figure 9).

25      Seul le cas B de la figure 9 (ligne inférieure) correspond à la souche souhaitée MG1655 ( $\Delta metB - \Delta metJ :: Cm$ ) où les gènes *metJ* et *metB* ont été éliminés et le promoteur de l'opéron *metBLF* replacé devant *metL*.

30      La cassette de résistance au chloramphénicol peut ensuite être éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment (MetLR et MetJR).

**Construction des souches MG1655  $\Delta(meIC :: Cm, meIJB)$  et MG1655  
 $\Delta(meIC, meIJB)$**

Pour déléter le gène *metC* (séquence 3150251 à 3151438, séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>) de la souche MG1655 ( $\Delta meIB - \Delta meIJ$ ), nous avons utilisé la technique de transduction avec le phage P1. Le protocole suivi est réalisé en deux étapes avec la préparation du lysat de phage sur la souche MG1655 ( $\Delta meIC :: Cm$ ) puis transduction dans la souche MG1655 ( $\Delta meIB - \Delta meIJ$ ).

Préparation du lysat de phage P1 :

- 10    - Ensemencement par 100 µl d'une culture de nuit de la souche MG1655 ( $\Delta meIC :: Cm$ ) de 10 ml de LB + Cm 30 µg/ml + glucose 0,2% + CaCl<sub>2</sub> 5 mM
- Incubation 30 min à 37°C sous agitation
- Ajout de 100 µl de lysat de phage P1 préparé sur la souche sauvage MG1655 (environ 1.10<sup>9</sup> phage/ml)
- 15    - Agitation à 37°C pendant 3 heures jusqu'à la lyse totale des cellules
- Ajout de 200 µl de chloroforme et vortex
- Centrifugation 10 min à 4500g pour éliminer les débris cellulaires
- Transfert du surnageant dans un tube stérile et ajout de 200 µl de chloroforme
- Conservation du lysat à 4°C
- 20    Transduction
  - Centrifugation 10 min à 1500g de 5 ml d'une culture de nuit de la souche MG1655 ( $\Delta meIB - \Delta meIJ$ ) en milieu LB
  - Suspension du culot cellulaire dans 2,5 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM
  - Tubes témoins : 100 µl cellules
- 25    100 µl phages P1 de la souche MG1655 ( $\Delta meIC :: Cm$ )
  - Tube test : 100 µl de cellules + 100 µl de phages P1 de la souche MG1655 ( $\Delta meIC :: Cm$ )
  - Incubation 30 min à 30°C sans agitation
  - Ajout de 100 µl de citrate de sodium 1 M dans chaque tube puis vortex
- 30    - Ajout de 1 ml de LB
  - Incubation 1 heure à 37°C sous agitation
  - Etallement sur des boîtes LB + Cm 30 µg/ml après centrifugation 3 min à 7000 rpm des tubes.

- Incubation à 37°C jusqu'au lendemain

Vérification de la souche

Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et l'insertion de la région contenant (*metC::Cm*) est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides MetCR et MetCF d'une part et MetJR et MetLR d'autre part afin de vérifier également la souche délestée des gènes *metB* et *metJ*. La souche retenue est dénommée MG1655 Δ(*metC ::Cm, metJB*).

- 5 MetCR (SEQ ID NO 21) : cgtccggacgcctgtatccggacgcaac (homologue à la séquence de 3151522 à 3151493)
- 10 MetCF (SEQ ID NO 22) : gcgtttacgcagtaaaaaagtaccaggcacgc (homologue à la séquence de 3150118 à 3150149)

15 Comme précédemment, la cassette de résistance au chloramphénicol peut ensuite être éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment (MetCR et MetCF d'une part et MetJR et MetLR d'autre part). La souche retenue est dénommée MG1655 Δ(*metC, metJB*).

20 **Construction du plasmide pTopo-metY**

Parallèlement un plasmide permettant l'expression du gène *metY* de *C. glutamicum* sera construit. Par exemple, ce gène peut être amplifié par PCR à partir d'ADN chromosomique de *C. glutamicum* puis introduit dans un plasmide. On pourra choisir d'amplifier par PCR le gène *metY* et éventuellement son promoteur naturel.

25 Dans un mode de réalisation préféré, on clonera le gène *metY* sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression dans *E. coli*. Les vecteurs utilisés pourront être choisis parmi les vecteurs pUC, pBluescript, pTopo, pCR-Script, ... Dans un mode de réalisation particulier, on pourrait utiliser le plasmide pSL191, décrit par Hwang *et al.* (2002) *J. Bact.* 184(5) : 1277-1286, qui comprend le gène *metY* sous le contrôle de son promoteur naturel cloné dans un vecteur navette *C. glutamicum* – *E. coli* pMT1.

30 La souche *Escherichia coli* Δ(*metC, metJB*) précédemment obtenue est transformée avec un plasmide portant le gène *metY* de *C. glutamicum*. La

transformation de la souche pouvant être réalisée selon l'une des techniques connues de l'homme du métier.

La souche obtenue sera ensuite inoculée dans un Erlen Meyer contenant 10% de son volume en milieu minimum avec glucose pour seule source de carbone. La faible activité succinylhomoserine sulfhydrylase initialement portée par l'enzyme MetY devrait limiter la croissance de la population bactérienne du fait d'une limitation en méthionine synthétisée. Des repiquages sont réalisés tous les 4 jours pendant 1 moins. L'amélioration de l'activité succinylhomoserine sulfhydrylase portée par la protéine MetY devrait se traduire par une synthèse accrue en méthionine ; on devrait donc observer une amélioration du taux de croissance de la population bactérienne entre chaque repiquage, ce qui imposera le cas échéant d'augmenter la fréquence de repiquage afin de maintenir les microorganismes dans une phase de division. On évitera en effet de maintenir trop longtemps les cultures dans une phase stationnaire. Lorsque le taux de croissance se stabilisera d'un repiquage à un autre, on considérera que la souche a suffisamment évolué et la sélection de trois clones sera réalisée. Leur séquençage permettra de déterminer la séquence évoluée *metY\**. Dans cette première étape, l'évolution du gène *metY* aura permis de modifier l'activité O-acetyl-homoséride sulfhydrylase en une activité O-succinyl-homoséride sulfhydrylase permettant de produire de l'homocysteine à partir d'O-succinylhomoséride et d'H<sub>2</sub>S ; ces deux substrats étant produits par la bactérie.

Afin d'optimiser le processus d'évolution de *metY*, une démarche similaire peut-être réalisée en utilisant d'autres mutants d'*Escherichia coli*, on pourra notamment utiliser le mutant  $\Delta(metC, metB)$ .

Exemple 9 : Procédé de culture Fed-Batch pour la production et la purification de méthionine.

Préculture :

La préculture est réalisée pendant une nuit en fiole de 500 ml contenant 50 ml de milieu minimum type M9 modifié, complété avec 2.5 g/l de glucose. Les cellules sont récupérées par centrifugation et reprises dans 5 ml de milieu minimum type M9 modifié.

Culture en fermenteur.

La culture est réalisée dans un fermenteur de volume utile de 300ml de type Fedbatch-pro DASGIP.

Le fermenteur est rempli avec 145 ml de milieu minimum type M9 modifié et inoculer avec les 5 ml de préculture. Soit une DO<sub>600nm</sub> d'inoculation comprise entre 5 0.5 et 1.2.

La température de la culture est maintenue entre 30 et 37°C et le pH est ajusté en permanence à une valeur comprise entre 6.5 et 8. Il est partiellement régulé par l'ajout d'une solution CH<sub>3</sub>SNa. Une solution de soude 2N peut le cas échéant compléter la régulation. L'agitation est maintenue à entre 200 et 400 rpm pendant la phase de batch et est augmentée jusqu'à 1000 rpm en fin de fed-batch. La teneur en O<sub>2</sub> dissout est maintenue entre 30% et 40% de saturation en utilisant un contrôleur de gaz. Dès que la OD<sub>600nm</sub> à une valeur comprise entre 2.5 et 3 nous commençons le fed-batch par ajout du milieu de fed à un débit initial compris entre 0.3 et 0.5 ml/h avec une augmentation progressive jusqu'à des débits compris entre 2.5 et 3.5 ml/h. 10 après ce stade le débit est maintenu constant pendant un temps compris entre 24h et 32h. Le milieu de fed est constitué sur la base d'un milieu M9 modifié complémenté par une concentration en glucose comprise entre 300 et 500g/l de glucose. Dans le même temps nous complétons le milieu avec une solution de CH<sub>3</sub>SNa (solution entre 1 et 5M) afin de permettre la croissance de la bactérie tout en régulant le pH. 15 Dès que la concentration cellulaire atteint une concentration comprise entre 20 et 50 g/l nous remplaçons le milieu de fed par un milieu minimum type M9 limité en phosphore. La solution de méthyl-mercaptan est remplacée par une injection directe de CH<sub>3</sub>SH sous forme gazeux dans le fermenteur. Le débit du gaz est adapté au débit de la solution de fed dans des rapports molaires avec le substrat carboné de 1 à 3. Dès 20 que la concentration cellulaire est comprise entre 50 et 80 g/l la fermentation est arrêtée. Le mout de fermentation est ajusté à un pH compris entre 7.5 et 9 par une solution de NaOH puis chauffé à entre 60 et 80°C. Le mout est ensuite filtré sur des modules UF. La température du jus est maintenue entre 60 et 80°C, puis le jus est concentré avant passage sur charbon pour décoloration (en colonne ou en bacth). Le 25 jus décoloré est de nouveau filtré pour retirer les dernières particules avant d'être acidifié par HCl concentré jusqu'à un pH inférieur à 2.28 (pK<sub>1</sub> de la méthionine). Les cristaux methionine.HCl ainsi formés sont récupérés par filtration, puis l'HCl est éliminé par évaporation pour purifier la L-Méthionine. 30

**Exemple 10: Production de méthionine avec une souche  $\Delta(meC)$**

La construction de la souche  $\Delta(meC)$  est décrite dans l'exemple 7. Dans un mode particulier de l'invention la souche *E. coli*  $\Delta(meC)$  est mise en culture en flacon (voir exemple 2) contenant un milieu minimum avec glucose comme seule source de carbone. Le milieu ne contient ni methylmercaptopan, ni H<sub>2</sub>S. Des repiquages sont réalisés et les taux de croissances sont déterminés pour chaque repiquage. On observe une très nette amélioration du taux de croissance de la souche  $\Delta(meC)$  sur milieu minimum (Voir Figure n° 7) suggérant que l'activité homocysteine synthase portée par la cystathionine  $\gamma$ -synthase s'est fortement améliorée en présence d'H<sub>2</sub>S endogène.

Cycles de repiquage N°	$\mu$ mesuré ( $h^{-1}$ )
1	0,05
3	0,37
5	0,39
10	0,44
12	0,44

**Dépôt de matériel biologique**

La Souche K183 a été déposé le 02 Avril 2003 à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France, selon les dispositions du Traité de Budapest, sous le Numéro d'ordre I-3005.

### Revendications

1. Souche de microorganisme produisant de l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique de formule générale (I)



5 dans laquelle R représente un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 18 atomes de carbones, éventuellement substitué par un ou des groupe(s) hydroxy, ou un radical aryle ou hétéroaryle comprenant un ou plusieurs atomes d'azote ou de soufre dans le cycle hétéroaromatique, sélectionné parmi les groupes phényle, pyridyle, pyrolyle, pyrazolyle, triazolyle, tetrazolyle, thiazolyle, ou thienyle,

10 par métabolisme d'une source de carbone simple et d'une source de soufre comprenant un composé de formule générale (II) :



dans laquelle R' représente un atome d'hydrogène ou R, R étant défini précédemment, et ses sels physiologiquement acceptables,

15 ladite souche comprenant au moins une gène codant pour une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée.

2. Souche selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée effectue la conversion directe d'un substrat dérivé de formule générale (III)

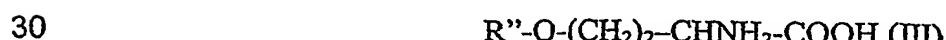


dans laquelle R'' représente un radical acyle, de préférence choisi parmi le radical succinyle ou le radical acétyle,

en acide aminé de formule générale (I).

3. Souche selon la revendication 2, caractérisée en ce que la source de soufre est un composé de formule générale (II) pour laquelle R' représente le radical R.

4. Souche selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée effectue la conversion d'un substrat dérivé de formule générale (III)



dans laquelle R'' représente un radical acyle, de préférence choisi parmi le radical succinyle ou le radical acétyle,

en homocystéine de formule générale (IV)



laquelle est ensuite transformée en acide aminé de formule générale (I) par une enzyme appropriée.

5. Souche selon la revendication 4, caractérisée en ce que la source de soufre est un composé de formule générale (II) pour laquelle R' représente un atome d'hydrogène.

6. Souche selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que R représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 4 atomes de carbone.

10. 7. Souche selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique de formule générale (I) obtenu est la L-méthionine.

8. Souche selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le microorganisme est choisi parmi les bactéries.

15. 9. Souche selon la revendication 8, caractérisée en ce que la bactérie est choisie parmi *E. coli* et les corynétactéries.

10. 10. Souche selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est choisie parmi les cystathionine-γ-synthases et les acylhomosérine sulfhydrylases à activité « méthionine synthase » modifiée.

20. 11. Souche selon la revendication 10, caractérisée en ce que la modification de l'enzyme consiste en une mutation de manière à ce que la transformation du substrat de formule générale (III) se fasse de manière préférentielle avec le composé de formule générale (II) plutôt qu'avec la L-cystéine.

25. 12. Souche selon l'une des revendications 10 et 11, caractérisée en ce que la cystathionine-γ-synthase à activité « méthionine synthase » non modifiée est sélectionnée parmi les cystathionine-γ-synthases correspondant au PFAM référence PF01053 et au COG référence CPG0626.

30. 13. Souche selon la revendication 12, caractérisée en ce que la cystathionine-γ-synthase à activité « méthionine synthase » non modifiée est la cystathionine-γ-synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO : 6, et les séquences homologues de cette séquence.

14. Souche selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » non modifiée, comprend la séquence d'acide aminés suivante dans sa partie C-terminale (zone conservée 1)

- 5      X1-X2-X3-L-G-X4-X5-X6-X7-X8-X9  
Dans laquelle  
X1 représente A,G,S, de preference A  
X2 représente E,V,P,T, de preference E  
X3 représente S,T,N, de preference S
- 10     X4 représente G,D,A,H,T, de preference G  
X5 représente V,A,T,H,N, de preference V.  
X6 représente E,R,K,F, de preference E  
X7 représente S,T, de preference S  
X8 représente L,I,V,A, de preference L et
- 15     X9 représente I,V,A,T, de preference I.

correspondant aux résidus 324 à 334 de la séquence de cystathionine- $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 6.

15. Souche selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » non modifiée, comprend la séquence d'acide aminés suivante dans sa partie N-terminale (zone conservée 2) :

- X10-X11-Y-X12-R-X13-X14-X15-X16-X17-X18
- Dans laquelle
- X10 représente H,Y,F,L,K, de preference A
- 25    X11 représente E,D,K,R,V,I, de preference Y
- X12 représente S,A,T,P,G, de preference S
- X13 représente I,S,T,R,E,F,W,D, de preference S
- X14 représente S,G,A,I,E,N,K,P, de preference G
- X15 représente N,H,Q,S, de preference N
- 30    X16 représente P,D,L, de preference P
- X17 représente T,M,N,G,S, de preference T et
- X18 représente R,L,V,S,W,E, de preference R.

14. Souche selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » non modifiée, comprend la séquence d'acide aminés suivante dans sa partie C-terminale (zone conservée 1)

5            X1-X2-X3-L-G-X4-X5-X6-X7-X8-X9

Dans laquelle

X1 représente A,G,S, de preference A

X2 représente E,V,P,T, de preference E

X3 représente S,T,N, de preference S

10          X4 représente G,D,A,H,T, de preference G

X5 représente V,A,T,H,N, de preference V

X6 représente E,R,K,F, de preference E

X7 représente S,T, de preference S

X8 représente L,I,V,A, de preference L et

15          X9 représente I,V,A,T, de preference I.

correspondant aux résidus 324 à 334 de la séquence de cystathionine- $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 6.

15. Souche selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » non modifiée, comprend la séquence d'acide aminés suivante dans sa partie N-terminale (zone conservée 2) :

X10-X11-Y-X12-R-X13-X14-X15-X16-X17-X18

Dans laquelle

X10 représente A, H,Y,F,L,K, de preference A

25          X11 représente Y, E,D,K,R,V,I, de preference Y

X12 représente S,A,T,P,G, de preference S

X13 représente I,S,T,R,E,F,W,D, de preference S

X14 représente S,G,A,I,E,N,K,P, de preference G

X15 représente N,H,Q,S, de preference N

30          X16 représente P,D,L, de preference P

X17 représente T,M,N,G,S, de preference T et

X18 représente R,L,V,S,W,E, de preference R.

correspondant aux résidus 44 à 54 de la séquence de cystathionine- $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 6.

16. Souche selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase modifiée comprend au moins une mutation dans sa partie C-terminale, et/ou au moins une mutation dans sa partie N-terminale.

17. Souche selon la revendication 16, caractérisée en ce que la mutation consiste à remplacer un acide aminé acide, lequel interagit avec le co-substrat cystéine pour l'enzyme non modifiée, par un acide aminé apolaire, sélectionné parmi les résidus glycine, alanine, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine ou méthionine.

18. Souche selon la revendication 17, caractérisée en ce que la mutation dans la partie C-terminale de la cystathionine- $\gamma$ -synthase est introduite parmi les acides aminés acides de la « zone conservée 1 » telle que définie dans la revendication 14, en particulier au niveau du résidu X2.

19. Souche selon la revendication 18, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie C-terminale :

X1-X2-X3-L-G-X4-X5-X6-X7-X8-X9

dans laquelle

X1, X3, X4, X5, X6, X7, X8 et X9 sont définis ci-dessus; et

20 X2 représente G,A,L,I,V,F,M, de préférence A.

correspondant aux résidus 324 à 334 de la séquence de cystathionine- $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 8.

20. Souche selon la revendication 19, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie C-terminale :

A-A-S-L-G-G-V-E-S

correspondant aux résidus 324 à 332 de la séquence de cystathionine- $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 6.

21. Souche selon la revendication 20, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « methionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés représentée sur la SEQ ID NO 8.

correspondant aux résidus 44 à 54 de la séquence de cystathionine- $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 6.

16. Souche selon l'une des revendications 12 à 15, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase modifiée comprend au moins une mutation dans sa partie C-terminale, et/ou au moins une mutation dans sa partie N-terminale.

17. Souche selon la revendication 16, caractérisée en ce que la mutation consiste à remplacer un acide aminé acide, lequel interagit avec le co-substrat cystéine pour l'enzyme non modifiée, par un acide aminé apolaire, sélectionné parmi les résidus glycine, alanine, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine ou méthionine.

18. Souche selon la revendication 17, caractérisée en ce que la mutation dans la partie C-terminale de la cystathionine- $\gamma$ -synthase est introduite parmi les acides aminés acides de la « zone conservée 1 » telle que définie dans la revendication 14, en particulier au niveau du résidu X2.

19. Souche selon la revendication 18, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie C-terminale :

X1-X2-X3-L-G-X4-X5-X6-X7-X8-X9

dans laquelle

X1, X3, X4, X5, X6, X7, X8 et X9 sont définis ci-dessus, et

20 X2 représente G,A,L,I,V,F,M, de préférence A.

correspondant aux résidus 324 à 334 de la séquence de cystathionine- $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 8.

21. Souche selon la revendication 19, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie C-terminale :

A-A-S-L-G-G-V-E-S

correspondant aux résidus 324 à 332 de la séquence de cystathionine- $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 6.

22. Souche selon la revendication 20, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « methionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés représentée sur la SEQ ID NO 8.

22. Souche selon l'une des revendications 17 à 20, caractérisée en ce que la mutation dans la partie N-terminale de la cystathionine- $\gamma$ -synthase est introduite parmi les acides aminés acides de la « zone conservée 2 » telle que définie ci-dessus, en particulier au niveau du résidu X11 et/ou R48 et/ou X13.

5 23. Souche selon la revendication 22, caractérisé en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acide aminés suivante dans sa partie N-terminale :

X10-X11-Y-X12-X19-X13-X14-X15-X16-X17-X18

dans laquelle

10 X7, X9, X12, X14, X15, X16, X17 et X18 sont définis ci-dessus, X11 est défini dans la revendication 15 ou représente un acide aminé apolaire, X13 est défini dans la revendication 15 ou représente un acide aminé apolaire, X19 est R ou représente un acide aminé apolaire, et l'un au moins de X11, X13 et X19 représente un acide aminé apolaire,

15 les acides aminés apolaires étant choisis indépendamment parmi les résidus glycine, alanine, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine ou méthionine.

24. Souche *E. coli* K183 à activité « methionine synthase » modifiée, déposée à la CNCM le 2 avril 2003 sous le numéro I-3005.

25. Cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée 20 telle que définie dans l'une des revendications 10 à 23.

26. Séquence d'acides nucléiques codant pour une cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « methionine synthase » modifiée selon la revendication 25.

27. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant une séquence d'acide nucléique selon la revendication 26, sous le contrôle d'éléments de régulation nécessaires à l'expression et la transcription de la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « methionine synthase » modifiée dans un organisme hôte.

28. Procédé de criblage d'une souche bactérienne initiale possédant un gène codant pour une enzyme cystathionine- $\gamma$ -synthase ou acylhomosérine sulfhydrylase, en vue d'obtenir une souche bactérienne génétiquement modifiée produisant un acide aminé de formule (I) défini selon l'une des revendications 1 à 7, et présentant une modification dans le gène de ladite enzyme, induisant une modification de l'activité « méthionine synthase » en présence d'un composé soufré

22. Souche selon l'une des revendications 17 à 20, caractérisée en ce que la mutation dans la partie N-terminale de la cystathionine- $\gamma$ -synthase est introduite parmi les acides aminés acides de la « zone conservée 2 » telle que définie ci-dessus, en particulier au niveau du résidu X11 et/ou R et/ou X13.

5 23. Souche selon la revendication 22, caractérisé en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acide aminés suivante dans sa partie N-terminale :

X10-X11-Y-X12-X19-X13-X14-X15-X16-X17-X18

dans laquelle

10 X7, X9, X12, X14, X15, X16, X17 et X18 sont définis ci-dessus,  
 X11 est défini dans la revendication 15 ou représente un acide aminé apolaire,  
 X13 est défini dans la revendication 15 ou représente un acide aminé apolaire,  
 X19 est R ou représente un acide aminé apolaire, et  
 l'un au moins de X11, X13 et X19 représente un acide aminé apolaire.  
 15 les acides aminés apolaires étant choisis indépendamment parmi les résidus glycine, alanine, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine ou méthionine.

24. Souche *E. coli* K183 à activité « methionine synthase » modifiée, déposée à la CNCM le 2 avril 2003 sous le numéro I-3005.

25. Cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée 20 telle que définie dans l'une des revendications 10 à 23.

26. Séquence d'acides nucléiques codant pour une cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « methionine synthase » modifiée selon la revendication 25.

27. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant une séquence d'acide nucléique selon la revendication 26, sous le contrôle d'éléments de régulation nécessaires à l'expression et la transcription de la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « methionine synthase » modifiée dans un organisme hôte.

28. Procédé de criblage d'une souche bactérienne initiale possédant un 30 gène codant pour une enzyme cystathionine- $\gamma$ -synthase ou acylhomosérine sulfhydrylase, en vue d'obtenir une souche bactérienne génétiquement modifiée produisant un acide aminé de formule (I) défini selon l'une des revendications 1, 6 ou 7, et présentant une modification dans le gène de ladite enzyme, induisant une modification de l'activité « méthionine synthase » en présence d'un composé soufré

22. Souche selon l'une des revendications 15 à 20, caractérisée en ce que la mutation dans la partie N-terminale de la cystathionine- $\gamma$ -synthase est introduite parmi les acides aminés acides de la « zone conservée 2 » telle que définie ci-dessus, en particulier au niveau du résidu X11 et/ou R et/ou X13.

5 23. Souche selon la revendication 22, caractérisé en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acide aminés suivante dans sa partie N-terminale :

X10-X11-Y-X12-X19-X13-X14-X15-X16-X17-X18

dans laquelle

10 X7, X9, X12, X14, X15, X16, X17 et X18 sont définis ci-dessus, X11 est défini dans la revendication 15 ou représente un acide aminé apolaire, X13 est défini dans la revendication 15 ou représente un acide aminé apolaire, X19 est R ou représente un acide aminé apolaire, et l'un au moins de X11, X13 et X19 représente un acide aminé apolaire, 15 les acides aminés apolaires étant parmi choisis indépendamment parmi les résidus glycine, alanine, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine ou méthionine.

24. Souche *E. coli* K183 à activité « methionine synthase » modifiée, déposée à la CNCM le 2 avril 2003 sous le numéro I-3005.

25. Cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée 20 telle que définie dans l'une des revendications 10 à 23.

26. Séquence d'acides nucléiques codant pour une cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « methionine synthase » modifiée selon la revendication 25.

27. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant une séquence d'acide nucléique selon la revendication 26, sous le contrôle d'éléments de régulation nécessaires à l'expression et la transcription de la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « methionine synthase » modifiée dans un organisme hôte.

28. Procédé de criblage d'une souche bactérienne initiale possédant un gène codant pour une enzyme cystathionine- $\gamma$ -synthase ou acylhomosérine sulfhydrylase, en vue d'obtenir une souche bactérienne génétiquement modifiée 30 produisant un acide aminé de formule (I) défini selon l'une des revendications 1, 6 ou 7, et présentant une modification dans le gène de ladite enzyme, induisant une modification de l'activité « méthionine synthase » en présence d'un composé soufré

de formule (II) défini selon l'une des revendications 1 à 7, présentant l'étape consistant à soumettre ladite souche bactérienne à une pression de sélection en présence du composé de formule (II), afin de diriger une évolution du gène codant pour ladite enzyme cystathionine- $\gamma$ -synthase ou acylhomosérine sulfhydrylase, dans 5 ladite souche bactérienne, ladite évolution consistant en une mutation pour leur permettre de réaliser de manière préférentielle la conversion directe du substrat de formule générale (III) défini selon l'une des revendications 1 à 7, en acide aminé de formule générale (I) ou en homocystéine de formule générale (IV) défini selon l'une des revendications 1 à 7.

10 29. Procédé de préparation d'un acide 2-amino-4(alkylmercapto)butyrique de formule (I) défini selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel on cultive un microorganisme à activité « méthionine synthase » modifiée défini selon l'une des revendications 1 à 24 ou obtenu par le procédé de sélection selon la revendication 28, en présence d'un composé soufré de formule générale (II) défini selon l'une des 15 revendications 1 à 7, dans un milieu approprié comprenant une source de carbone simple.

30. Procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce que l'acide aminé de formule (I) est la méthionine, plus préférentiellement L-méthionine.

31. Procédé selon la revendication 30, caractérisé en ce que le composé 20 soufré de formule (II) est le méthyl-mercaptopan ou l'H2S.

32. Procédé de préparation d'un acide 2-amino-4(alkylmercapto)butyrique de formule (I) défini selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel on fait réagir substrat dérivé de formule générale (III)



25 dans laquelle R'' représente un radical acyle, de préférence choisi parmi le radical succinyle ou le radical acétyle,

avec une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée telle que définie dans l'une des revendications 1 à 23, dans un milieu réactionnel approprié comprenant un composé soufré de formule générale (II) défini dans l'une des 30 revendications 1 à 7.

33. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est présente dans une bactérie inactivée ou dans un extrait cellulaire.

de formule (II) défini selon l'une des revendications 1, 3, 5, 6 ou 7, présentant l'étape consistant à soumettre ladite souche bactérienne à une pression de sélection en présence du composé de formule (II), afin de diriger une évolution du gène codant pour ladite enzyme cystathionine- $\gamma$ -synthase ou acylhomosérine sulfhydrylase, dans

5 ladite souche bactérienne, ladite évolution consistant en une mutation pour leur permettre de réaliser de manière préférentielle la conversion directe du substrat de formule générale (III) défini selon la revendication 2, en acide aminé de formule générale (I) ou en homocystéine de formule générale (IV) défini selon la revendication 4.

10 29. Procédé de préparation d'un acide 2-amino-4(alkylmercapto)butyrique de formule (I) défini selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel on cultive un microorganisme à activité « méthionine synthase » modifiée défini selon l'une des revendications 1 à 24 ou obtenu par le procédé de sélection selon la revendication 28, en présence d'un composé soufré de formule générale (II) défini selon l'une des revendications 1 à 7, dans un milieu approprié comprenant une source de carbone simple.

15 30. Procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce que l'acide aminé de formule (I) est la méthionine, plus préférentiellement L-méthionine.

20 31. Procédé selon la revendication 30, caractérisé en ce que le composé soufré de formule (II) est le méthyl-mercaptopan ou l'H<sub>2</sub>S.

32. Procédé de préparation d'un acide 2-amino-4(alkylmercapto)butyrique de formule (I) défini selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel on fait réagir substrat dérivé de formule générale (III)



25 dans laquelle R'' représente un radical acyle, de préférence choisi parmi le radical succinyle ou le radical acétyle,

30 avec une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée telle que définie dans l'une des revendications 1 à 23, dans un milieu réactionnel approprié comprenant un composé soufré de formule générale (II) défini dans l'une des revendications 1 à 7.

33. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est présente dans une bactérie inactivée ou dans un extrait cellulaire.

34. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est une enzyme purifiée.
35. Procédé selon l'une des revendications 32 à 34, caractérisé en ce que l'enzyme est une cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée telle que définie dans l'une des revendications 10 à 23.

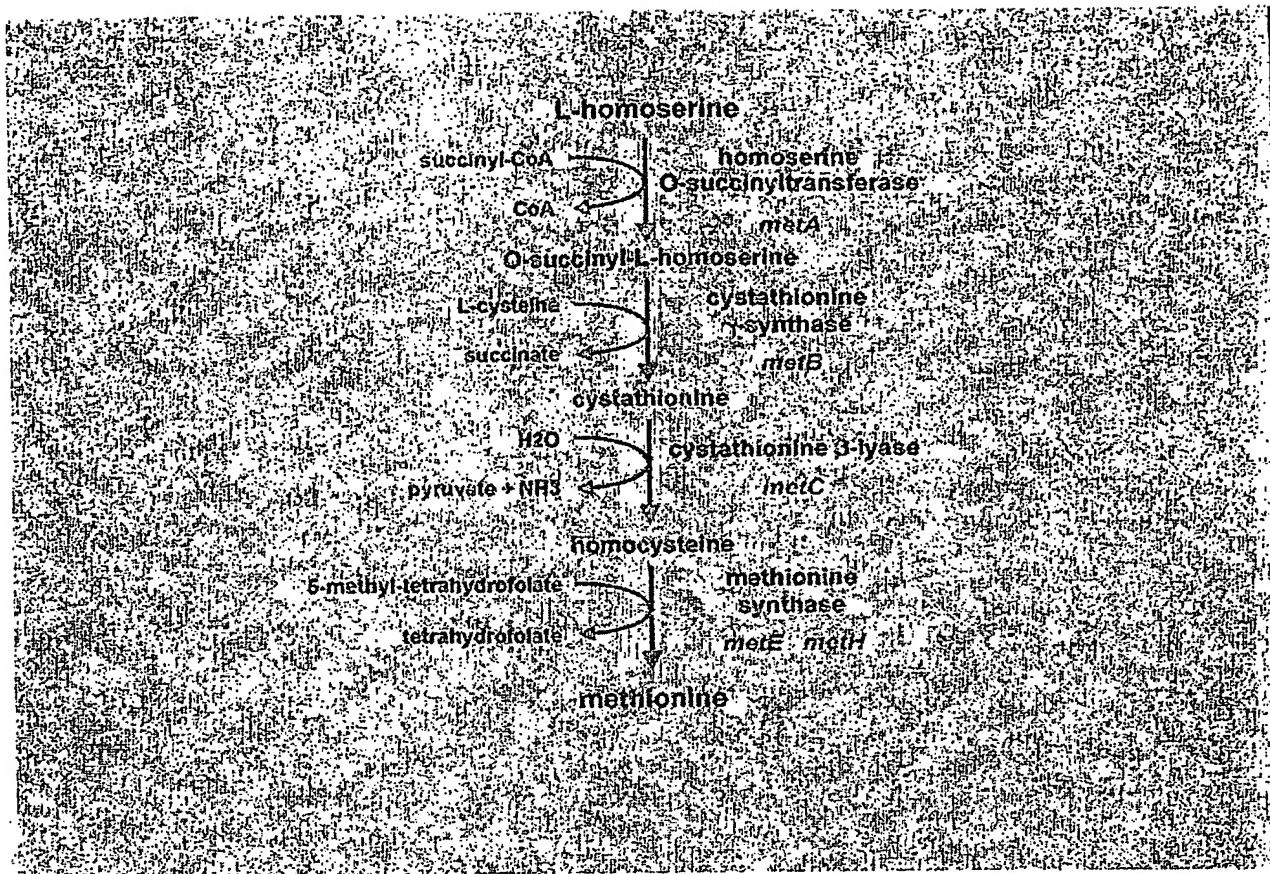


Figure 1

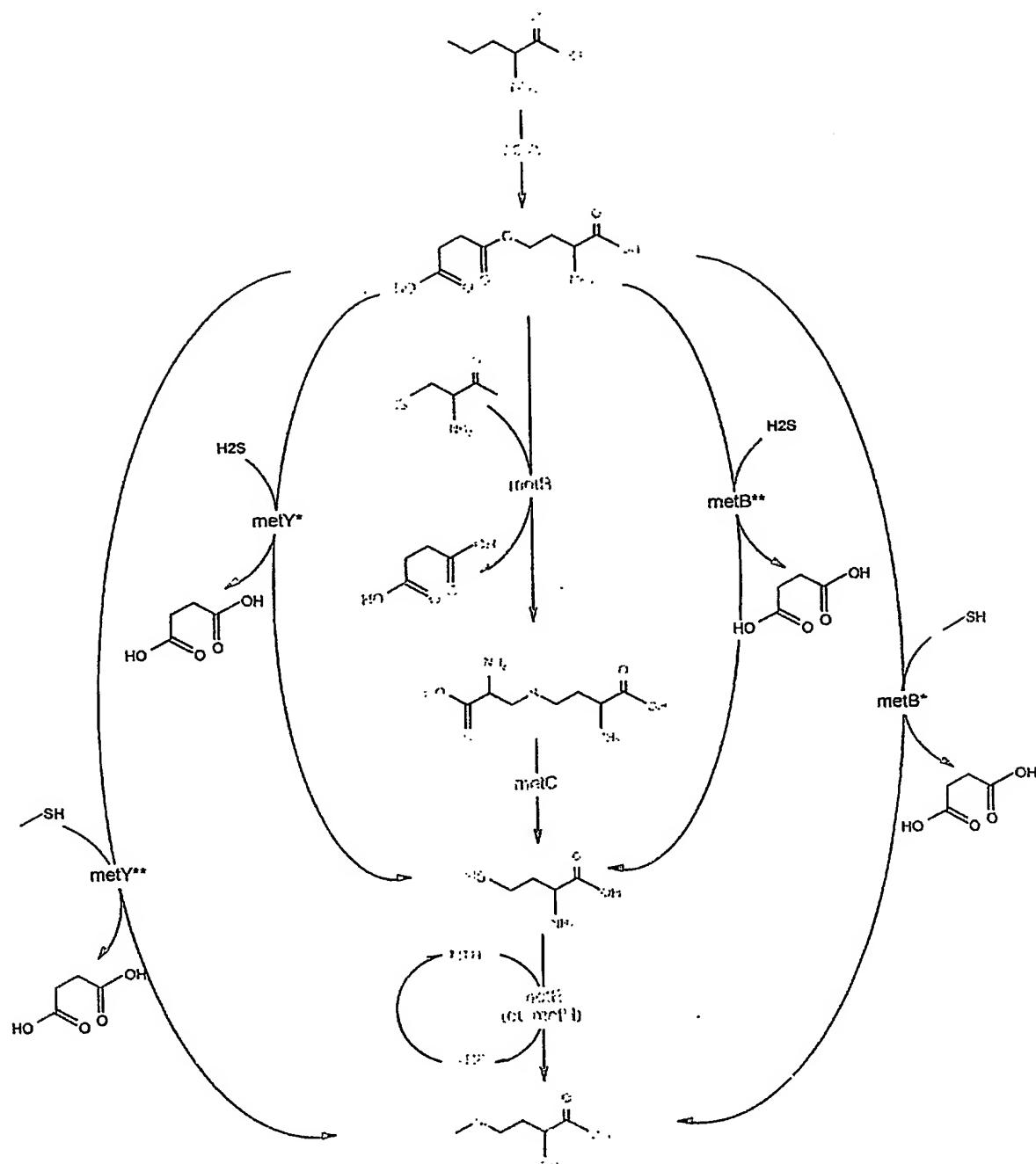


Figure 2

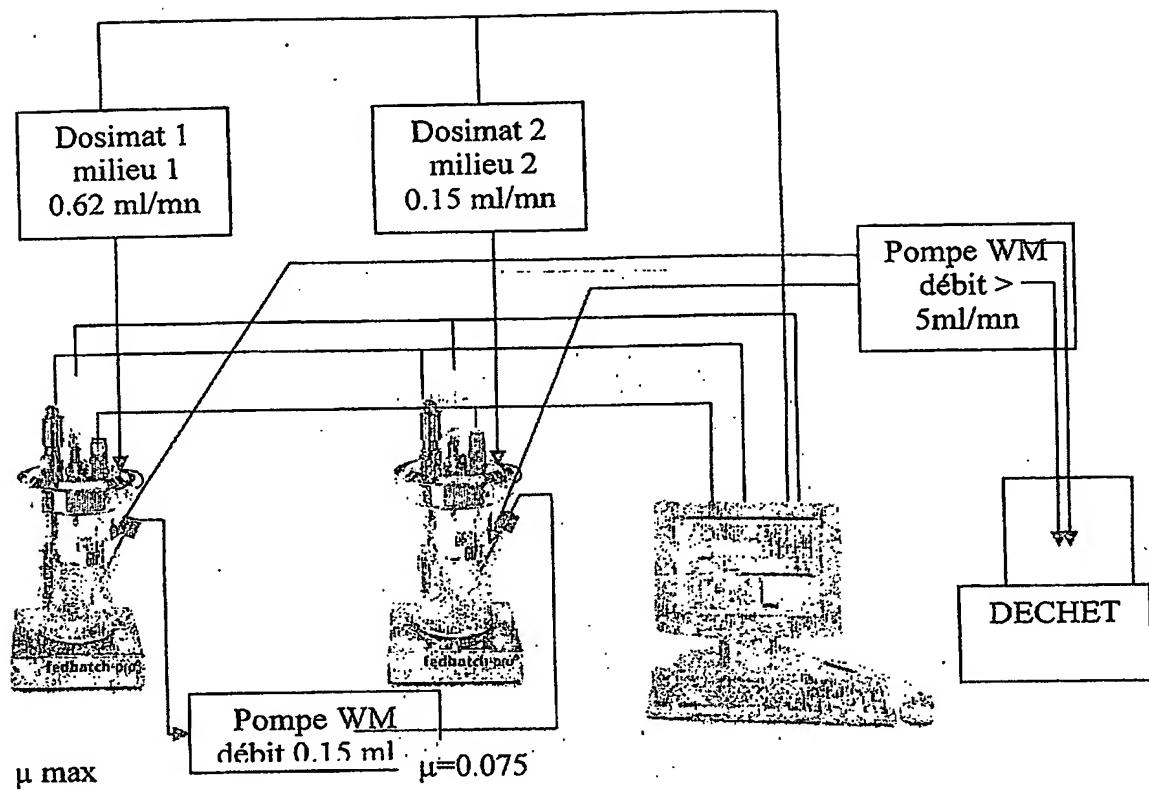


Figure 3

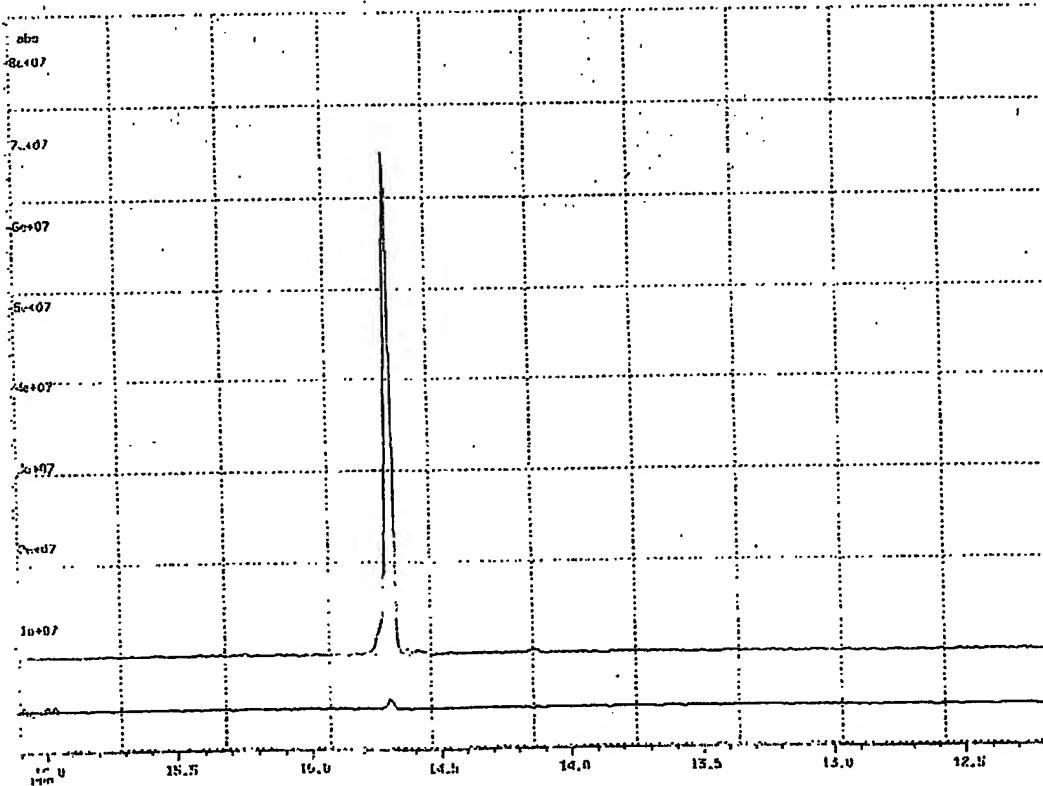


Figure 4

1

	Q92IAW7 NP_373671 P46807 CAD30944 NP_696324 AAC29646 NP_638204 BAC61025 NP_719585 NP_418374 NP_457953 NP_353370 NP_733043 NP_501979: ERA30199	MLFPTPTIAS RCYDETERSRA PADVCSNTEV VNLVDMSDP EARALIEPLCP SISAVIMPQD GPFKAKOYWO HSGDGSSRR AEFCHGLFKD GLLRPDTELR Consensus		
101	Q92IAW7 NP_373671 P46807 CAD30944 NP_696324 AAC29646 NP_638204 BAC61025 NP_719585 NP_418374 NP_457953 NP_353370 NP_733043 NP_501979: ERA30199	MLFPTPTIAS RCYDETERSRA PADVCSNTEV VNLVDMSDP EARALIEPLCP SISAVIMPQD GPFKAKOYWO HSGDGSSRR AEFCHGLFKD GLLRPDTELR Consensus		
200				
		MRMOT KLIHGGINE- MNKT KLIRGHTT- MSEDIR GHHGIGLAT KAIIHGYRP- NBMIS DRHSQHFET LATHAGNTA- MSAEIN AKPANTDIAT RAIIHCEP- NAJHD VHEFTCHVT SAVRAGIDS- NSFD PADAPCSAAI AAVRAGIDR- NTEG KLYTERQLAT LAVROGES- NTRKOAT TAVRSGND- NP_457953 BAC61025 NP_126586 NP_343729 NP_539021	DATTGAVSVP IYQSTYRQD AIGR-HKGYE DDYTGAIVTP IYQSTYRQD DIGDLRQYE DPATGAVNVP IYASSTFAQD GVGLRGFE DELTGAIVTP IYQSTYRQD GVGLRGFE DPTGAVYTP IFANISTKQD GVGLRGHD DTAHGAVYTP IYLSSEHSEE REGHKRK-YD DTAYGAVTPP IYLSSENSEDF GEENKRQ-YD DTQYGAIVPP IYLSSTYAFD GHKNPRE-FD DQYGCVYPP IHLSSTYNT GNEPRA-HD DEQYGCVYPP IHLSSTYNT GNEPRA-HD DSQYHAWVPP IYLSSTYGFQ ARGEVPK-YD REGEIKPL HDPLYITAVE KOVGDDEPYTD ROTELK--- MK DATRAVEDI DDUITGAITTP IYQTSAYHYP EGEKYR--- ELSEGAVKPP VLTSITVFK TAEDGRDFD MSKELHINT ILAQAGKSD -EATGALVTP IHESTTYQHP EFGESTGFD- WT KQAREKHIFT RLAQAGRSD DEKTGAIISAP TYLSSTAVRHA GIGGSTGFD- WTFYPPSY PINPAWRPT VTVQAGRPA- RTGPAPMNPP ITLSSTVHD SERA--- NP_358970 NP_786043 NP_601979: ERA30199	-----YSR SGNPTRFALE -----YSR SANPRTSVE -----YAR TGMPMRAALE -----YSR SANPRTALE -----YSR SANPRTSFD -----YTR SANPRTDILG -----YTR SGNPTRDILG -----YSR SGNPTRSTLG -----YSR RGNPTRDVVQ -----YSR RGNPTRDVVQ -----YTR SGNPTRVKE -----YSR EENPTRYLEA -----YSR ESNPTRYLEA -----YTR TKNPTRSKAE -----YPR EAQPTRCILE -----YGR DGNDGRGAFE -----YGR SPSLSKQMS -----YSR ..nptr..le d...g...t...g...p...i...lsst3... Consensus

Figure 5

Figure 5 (Suite)

401

LLQRGKTTG LREAHQHNA IVAEELKH PK--VERVYU PGIDTHPNHE JAKAMQHG-- FSGMFSETLK NDSEAVAFV ESLKLFILGE SLGGVTSLVG  
 Q92MWT LLVPGKFTLG LMEQINRSV IELIMLHD VHMQADG-- HFGVIAFEVK -NTESAKOLI KATSYTTLAE SLGAVESLIS  
 NP\_373671 LTRGRKTLY LEMORHNEVA ITVAEFLAHH PS--VSAWLY PGPSHPGHE VAARQHG-- FGGMVSLMRM AGRLAQDLC ARTKVETLAE SLGGVESLIE  
 P46807 CAD30944 LVLRGKTTA VANDRHSENA KVADMILSRH AR--VTSVLY PGLEPERPGHE VAAKOMEA-- FGGMYSFVE GEORAVEVN NRKAVFTLAE SLGGVESLIE  
 NP\_696324 LDINGKTTA LKVERHSNA IKVARELSES PSDVIERTWY PGLESHPGHE IAQRMHGG-- DHTQFLTAE SLGGVESLIE  
 AAC23646 LTLGKPTTD ALPHVHOENA OMIAALLEGH GV--VKKHWH PGFLASHPGHV LAGRQOKG-- FGAMLSFELQ GCEAVAFV SCRYFTLAE SLGGVESLIE  
 NP\_538204 LTLGKSTED ALPHVHOENA DAIVLILDEH AA--VNQVYF PGFLASHPGHA LAARQOKG-- FGAMLSFELN GCEAVAFV DGLRYFTLAE SLGGVESLIE  
 NP\_719566 OTLPGR--TA VFFEH2PJA QRIVELNSH PV--VSKVYI PGЛАDRPGHA IAQKQOKG-- FGAMLSFELK GGEAEVVAFL DALSLFSVAE SLGGVESLVA  
 NP\_418374 LLRGKTTV PKEBLAQNA QAIYVYQTO PL--VKKLYH PSLPRNGHE IAARQOKG-- FGAMLSFELT GDEOTLRFVL CGLSLFTLAE SLGGVESLIS  
 NP\_457953 LLFGCPTLW PKEBLAQNA QAIYVYQTO PL--VKKLYH FSLPRNGHE IAARQOKG-- FGAMLSFELQ KELEFLSLAE SLGGVESLIC  
 BAC11228 NTLEGPFLS LK-VVHEE5C OHVLUYCCQ AL--VATIYH PSLPDPGHE TAKKOOSG-- FGAMLSFELA GSFEQLKVFV  
 NP\_126536 KIERSVTE V-FEFZEEKA MAIREF-KDH PK--VREWYH PGKDPDYZK VARRLEFKDL YGGMVAFDL SG-DNALAFI RGLRIFPSL SLGGVESLIT  
 NP\_343273 LLRGKTTK L-FDUDVNPMA RQIAEFLKH PK--VVKVYI PGGLKSVDYD TARKVLKG-- FGCVLSFEVN GGQESALKVN KSLKLJPAQ TLGCVNSVLS  
 NP\_539021 MLGRSLELNG LEMERADSNA RQIAEFLRNH PK--VKEKLHY LPFADERSDI AALFKRQCTG AGSTSFEDIK GGDDAAFRFL NALQIKLAV SLGGVESLIT  
 NP\_388970 QLPGKLTIS LPMERTSNA QEVVAFKDS PA--VKEVLY TGR---- GMISMPLA TGTD-VDTFL BALNVSFAE SLGGVESLIT  
 NP\_786043 LLIFSLKLTIP LRLHCOENA QELVTVLED EH--VERVLY SGR---- GMISMPLA ATPERTDDEI ESSLSLTHAT SLGGVETATE  
 NP\_601979: LARGLYSEA VRLDRAESNA AELSRELNH PS--VTRVNY PGGLPDFOQE KAVRVLPSG- CGNMISFELD AIPERTDDEI ESSLSLTHAT SLGTNFITS  
 ERA30199 FERNSRDFV AFIDRTANA EALCRVQDH PL--VKTLYX PRYNDRANV EAVLQPQQG- YGLLISVYLK -GRKQAVAFY DAIEF-AKGP SLGTNFITS  
 Consensus 1.leg1.tl. .Sm....na...i...L.h.p. v...v.y pg1..hp.h. .a.q...g...f. .g...a...f. .1...f.1ae SLGGv#sl1.

562

501

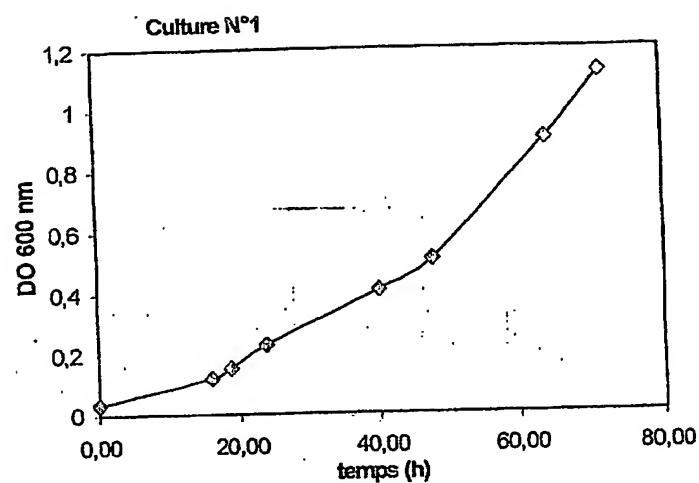
IPBLNTH-CI PKEQRAEGI RDGLVRLSVG TEHEODLLED LDQAFAKIS  
 NP\_373771 VPEALNTH-SI PADIRAEKG TDGVURISVG IEDTEBVDD LKQALDTL  
 P46507 QPSAETHA ST TSOLE---V PDDGLVRLSVG IEDVGDLCD LKQALN  
 CAD30944 HPGSMTH-SA AGSALE---V PADLVLSVG IENADDLJD LKQALDLC  
 NP\_696324 VZPANTHASV AGTTLQ---V PANLVRISVG TENADDLJD LKQALDRI  
 AAO29546 HPASITH-LAM TPEAKAKGI SDGIGRLSVG IEASEDILVD LVAGLALARVA AVSAVARKV DA  
 NP\_638204 HPASITH-LAM TPEAKALAGI SDGIGRLSVG IEASEDILVD LVAGLALARVA AVSAVARKV  
 NP\_719586 VPATITHPMN EPOARFEAGI KDTLRLRSVG IEDADMIVAD IQAGLAAVA CQ  
 NP\_418374 HAATITHAGM APEARALAGI SETLRLSTG IEDGEDLJD LENGFRAANK C  
 NP\_457953 HAATITHAGM SQPARAAGI SHOURLSVG LEDQDLDJAD LQDQFKAQ  
 BAC61028 HPASITHRAM GEERALAEGY SHOURLSVG LEDQDLDJAD LQDQFKAQ  
 NP\_126536 YPKNSKAESTL DEPIEFLTG TDGLJRSVG LSPLDLLED IDNAIGVVR  
 NP\_343729 HPATISH2TL SUPERKIVG TDLSLRSVG IEDVNDLLED LDRALSTLY  
 NP\_539021 HPAAMTH5GV PWDVREIGV LESTIRLSIG IEPHDDLJD LAQALDAA  
 NP\_358970 YPTTQT:DI PAEVPHSYGL TDDLPLSIC IEDARDLJD LRQALEG  
 NP\_786043 VPAVQTH2DL TEEGRQSKGI TANLRSVG IENSADLJD LKQALRATK  
 NP\_601979: -----SRT PRDAEVVAGV PMLCRVSG IEDVEDLLED LNASTDKVLG  
 ERA30199 PYVLLAHQ- ELWPAQYGV DRNLK13VG LEGTDELINV FTRAKVAEE QSQYP  
 Consensus .pa.mthaa...r...y! ...L.RLSIG 1E...#Li.D 1.qal.....

Figure 5 (fin)

Figure 6

401                    467  
 NP\_785569 QLESSLANVA LAKSLIITHA STHAQOLNEQ ELLARGVTPD LIRISUGVEN ADDLIADLQ ALAQV  
 NP\_712243 ELFSELLAVG FASLVTHFA STHQQLTE EQLSNGTPD FVRISUGLEN IEDLFDLEE ALKKV  
 NP\_59386: AANG8137 QFVURLVITIG FASLACH2A STTARQLND ELELAGYPRD MVLSLGIEH SDDTIADLAQ ALEASRG  
 NP\_59386: KHSNHLATIG DIPSEWVHPA TTTHSOSDEA GLABAGVTOS TVRLSVGET IDDIADLEG GFAAI  
 NP\_59386: BAC46370 EFKISNLIG DAKSLVTHA TTTHORLPE DRAALGSEG FIRFSAGLEH ADDLIEDLTA ALEKA  
 AA051379 RJSITANLZ TETTITHA TISHGRLPQ EREAGYRDS LRVAVGLED VADQADLAR GLAAL  
 AAA33415: RTSSITLG DKTIIHZA TISHGRLPSE DRARAGIGDS LRVAVGLED LODKADMAR GLAAL  
 NP\_284520. EJESRTAHLG UVRSTIHW TITHGRMOP EKLARNIRPG INRLSVGLEY VGDJDDLQ ALAR  
 Consensus            L.s..atig Daks1..HPa tTH.rl.pe e..aag!... .!RISVGE. .ddiadiL.. ala....

Figure 6 (fin)



Repiquage 10

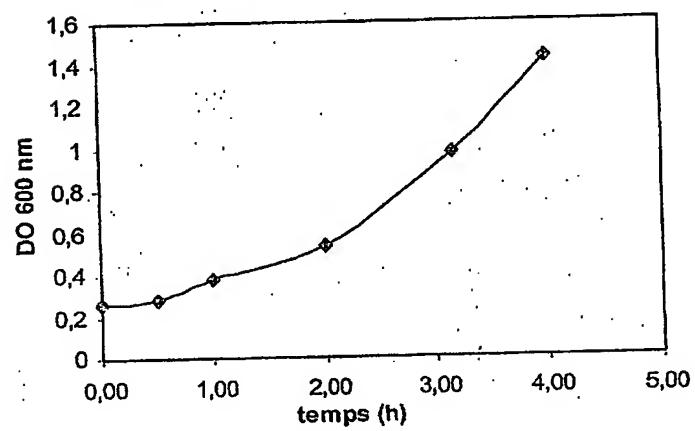


Figure 7

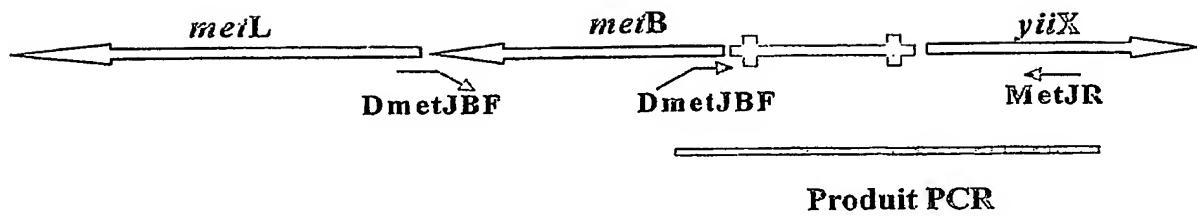


Figure 8

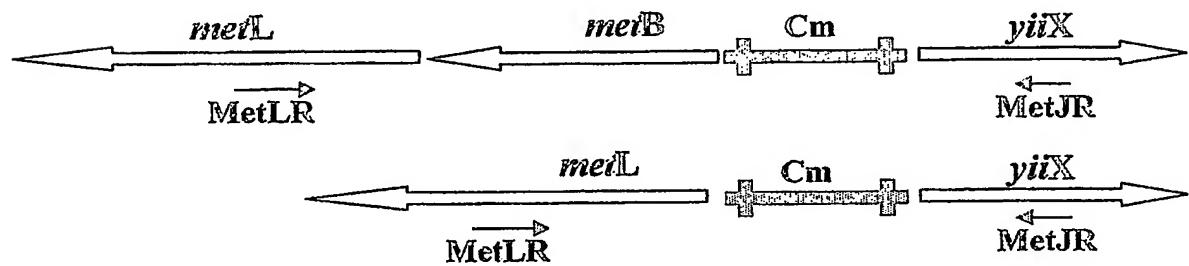


Figure 9

## LISTE DE SEQUENCE

<110> Metabolic Explorer

<120> Microorganisme à activité méthionine synthase modifiée et procédé de préparation de la méthionine

<130> D21189

<150> FR 03/01 924

<151> 2003-02-18

<160> 19

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 42

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Promoteur pTAC-O

<400> 1

gagctgttga caattaatca tcggctcgta taatgtgtgg aa

42

<210> 2

<211> 44

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Promoteur pLAC-O

<400> 2

ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg tataatgtgt ggaa

44

<210> 3

<211> 43

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Promoteur pTRC-O

<400> 3

gagctgttga caattaatca tccggctcgta ataatgtgtg gaa

43

<210> 4

<211> 44

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Promoteur pTHLA

<400> 4

aatatattga taaaataat aatagtgggt atatattaatg tgtt

<210> 5  
<211> 1161  
<212> ADN  
<213> Escherichia coli

<220>  
<223> Séquence non mutée

<400> 5  
atgacgcgta aacaggccac catcgcaatc cgtagcgggt taaatgacga cgaacagtt 60  
gggtgcgttg tcccaccat ccattttcc agcacctata actttaccgg attaatgaa 120  
ccgcgcgcgc atgattactc gcgtcgccgc aacccaacgc gcgtgtggg tcagcgtgcg 180  
ctggcagaac tggaaagggtgg tgctgggtca gtacttacta ataccggcat gtccggcatt 240  
cacctggtaa cgaccgttcc tttgaaacct ggcgatctgc tggttgcgcgc gcacgactgc 300  
tacggcggtt gctatcgctt gttcgacagt ctggcgaaac gcggttgcta tcgcgtgttg 360  
tttgttgatc aaggcgatga acaggcatta cgggcagcgc tggcagaaaa acccaaactg 420  
gtactggtag aaagccccaa taatccattt ttacgcgtcg tggtatattgc gaaaatctgc 480  
catctggcaa gggaaagtccg ggcgggtgagc gtgggtggata acacccctt aagccccggca 540  
ttacaaaatc cgctggcatt aggtgccat ctgggtttgc attcatgcac gaaatatctg 600  
aacggtcact cagacgtatc ggccggcgtt gtgattgcta aagacccggaa cgttgcact 660  
gaactggcct ggtggggcaaa caatattggc gtgacggcg ggcgtttga cagctatctg 720  
ctgctacgtg ggttgcgaac gctgggtccg cgtatggagc tggtgcagcg caacgcgcag 780  
gcatgttga aatacctgca aaccggccg ttgggaaaa aactgtatca cccgtcggtt 840  
ccggaaaaatc agggggcatga aattggcccg cgccagaaaa aaggctttgg cgcaatgttg 900  
agttttgaac tggatggcga tgagcagacg ctgcgtcggtt tctctggcgg gctgtcggtt 960  
tttacgctgg cggaatcatt agggggagtg gaaagttaa tctctcacgc cgcaaccatg 1020  
acacatgcag gcatggcacc agaagcgcgt gctgccccc ggatctccga gacgctgctg 1080  
cgtatctcca ccggatttga agatggcga gatttaattt ccgaccttggaa aatggcttc 1140  
ccggctgcaaa acaagggtt a 1161

<210> 6  
<211> 386  
<212> PRT  
<213> Escherichia coli

<220>  
<223> Séquence non mutée

<400> 6

Met	Thr	Arg	Lys	Gln	Ala	Thr	Ile	Ala	Val	Arg	Ser	Gly	Leu	Asn	Asp
1		5				10							15		

Asp	Glu	Gln	Tyr	Gly	Cys	Val	Val	Pro	Pro	Ile	His	Leu	Ser	Ser	Thr
		20				25						30			

Tyr	Asn	Phe	Thr	Gly	Phe	Asn	Glu	Pro	Arg	Ala	His	Asp	Tyr	Ser	Arg
	35				40						45				

Arg	Gly	Asn	Phe	Thr	Arg	Asp	Val	Val	Gln	Arg	Ala	Leu	Ala	Glu	Leu
		50			55				60						

Glu	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Val	Leu	Thr	Asn	Thr	Gly	Met	Ser	Ala	Ile
65					70			75			80				

His	Leu	Val	Thr	Thr	Val	Phe	Leu	Lys	Pro	Gly	Asp	Leu	Leu	Val	Ala
		85				90						95			

Pro His Asp Cys Tyr Gly Gly Ser Tyr Arg Leu Phe Asp Ser Leu Ala  
 100 105 110  
 Lys Arg Gly Cys Tyr Arg Val Leu Phe Val Asp Gln Gly Asp Glu Gln  
 115 120 125  
 Ala Leu Arg Ala Ala Leu Ala Glu Lys Pro Lys Leu Val Leu Val Glu  
 130 135 140  
 Ser Pro Ser Asn Pro Leu Leu Arg Val Val Asp Ile Ala Lys Ile Cys  
 145 150 155 160  
 His Leu Ala Arg Glu Val Gly Ala Val Ser Val Val Asp Asn Thr Phe  
 165 170 175  
 Leu Ser Pro Ala Leu Gln Asn Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val  
 180 185 190  
 Leu His Ser Cys Thr Lys Tyr Leu Asn Gly His Ser Asp Val Val Ala  
 195 200 205  
 Gly Val Val Ile Ala Lys Asp Pro Asp Val Val Thr Glu Leu Ala Trp  
 210 215 220 225  
 Trp Ala Asn Asn Ile Gly Val Thr Gly Gly Ala Phe Asp Ser Tyr Leu  
 230 235 240  
 Leu Leu Arg Gly Leu Arg Thr Leu Val Pro Arg Met Glu Leu Ala Gln  
 245 250 255  
 Arg Asn Ala Gln Ala Ile Val Lys Tyr Leu Gln Thr Gln Pro Leu Val  
 260 265 270  
 Lys Lys Leu Tyr His Pro Ser Leu Pro Glu Asn Gln Gly His Glu Ile  
 275 280 285  
 Ala Ala Arg Gln Gln Lys Gly Phe Gly Ala Met Leu Ser Phe Glu Leu  
 290 295 300  
 Asp Gly Asp Glu Gln Thr Leu Arg Arg Phe Leu Gly Gly Leu Ser Leu  
 305 310 315 320  
 Phe Thr Leu Ala Glu Ser Leu Gly Gly Val Glu Ser Leu Ile Ser His  
 325 330 335  
 Ala Ala Thr Met Thr His Ala Gly Met Ala Pro Glu Ala Arg Ala Ala  
 340 345 350  
 Ala Gly Ile Ser Glu Thr Leu Leu Arg Ile Ser Thr Gly Ile Glu Asp  
 355 360 365  
 Gly Glu Asp Leu Ile Ala Asp Leu Glu Asn Gly Phe Arg Ala Ala Asn  
 370 375 380  
 Lys Gly  
 385  
 <210> 7  
 <211> 1161

<212> ADN  
 <213> Escherichia coli

<220>  
 <223> Séquence mutée - souche K183

<400> 7		
atgacgcgt aacaggccac catcgactg cgtagcgggt taaatgacga cgaacagtat	60	
ggttgcgtt gccccccat ccacatccc acgacccata actttaccgg atttaatgaa	120	
ccgcgcgcgc atgattactc gcgtcgcc aacccaacgc gcgtatgtgg tcagcgtcg	180	
ctggcagaac tggaaagggtt tgcttgca gtacttacta ataccggcat gtccgcgatt	240	
cacctggtaa cgaccgtctt tttgaaacct ggcgatctgc tgggtgcgcc gcacgactgc	300	
tacggcgta gctatcgctt gttcgacagt ctggcggaaac gcgggttgcta tcgcgtgtt	360	
tttgttgc aaggcgatga acaggcatta cgggcagcgc tggcagaaaa acccaaactg	420	
gtactggtag aaagcccaag taatccattt ttacgcgtcg tggatattgc gaaaatctgc	480	
catctggcaa gggaaagtgg ggcgttgacgt gtggtgata acacccctt aagccggca	540	
ttacaaaatc cgctggcatt aggtggcgtt ctgggtgtgc attcatgcac gaaatatctg	600	
aacggtaact cagacgttgtt ggccggcgtt gtgattgtca aagacccgga cggtgtcact	660	
gaactggcct gttggggcaaa caatattggc gtgacggcgc gcgcgtttga cagctatctg	720	
ctgctacgtt gtttgcaac gctggtgccg cgtatggagc tggcgcagcg caacgcgcag	780	
gcgtatgtga aatacctgca aacccagccg ttggtaaaaa aactgtatca cccgtcgtt	840	
ccggaaaatc agggggcatga aattggcccg cgccagaaaa aaggctttgg cgcaatgtt	900	
agtttgaac tggatggcga tgagcagacg ctgcgtcggtt tcctggcgg gctgtcgtt	960	
tttacgtgg cggcatcatt agggggagtg gaaagttaa tctctcacgc cgcaaccatg	1020	
acacatgcag gcatggcacc agaagcgcgt gctgccccc gnatctccga gacgctgctg	1080	
cgtatctcca ccggttattga agatggcgaa gatttaattt ccgaccttggaa aatggcttc	1140	
cgggctgcaaa acaaggggta a	1161	

<210> 8  
 <211> 386  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

<220>  
 <223> Séquence mutée - souche K183

<400> 8

Met Thr Arg Lys Gln Ala Thr Ile Ala Val Arg Ser Gly Leu Asn Asp		
1	5	10
15		

Asp Glu Gln Tyr Gly Cys Val Val Pro Pro Ile His Leu Ser Ser Thr		
20	25	30

Tyr Asn Phe Thr Gly Phe Asn Glu Pro Arg Ala His Asp Tyr Ser Arg		
35	40	45

Arg Gly Asn Pro Thr Arg Asp Val Val Gln Arg Ala Leu Ala Glu Leu		
50	55	60

Glu Gly Gly Ala Gly Ala Val Leu Thr Asn Thr Gly Met Ser Ala Ile		
65	70	75
80		

His Leu Val Thr Thr Val Phe Leu Lys Pro Gly Asp Leu Leu Val Ala		
85	90	95

Pro His Asp Cys Tyr Gly Gly Ser Tyr Arg Leu Phe Asp Ser Leu Ala		
100	105	110

Lys Arg Gly Cys Tyr Arg Val Leu Phe Val Asp Gln Gly Asp Glu Gln

115

120

125

Ala Leu Arg Ala Ala Leu Ala Glu Lys Pro Lys Leu Val Leu Val Glu  
 130 135 140

Ser Pro Ser Asn Pro Leu Leu Arg Val Val Asp Ile Ala Lys Ile Cys  
 145 150 155 160

His Leu Ala Arg Glu Val Gly Ala Val Ser Val Val Asp Asn Thr Phe  
 165 170 175

Leu Ser Pro Ala Leu Gln Asn Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val  
 180 185 190

Leu His Ser Cys Thr Lys Tyr Leu Asn Gly His Ser Asp Val Val Ala  
 195 200 205

Gly Val Val Ile Ala Lys Asp Pro Asp Val Val Thr Glu Leu Ala Trp  
 210 215 220

Trp Ala Asn Asn Ile Gly Val Thr Gly Gly Ala Phe Asp Ser Tyr Leu  
 225 230 235 240

Leu Leu Arg Gly Leu Arg Thr Leu Val Pro Arg Met Glu Leu Ala Gln  
 245 250 255

Arg Asn Ala Gln Ala Ile Val Lys Tyr Leu Gln Thr Gln Pro Leu Val  
 260 265 270

Lys Lys Leu Tyr His Pro Ser Leu Pro Glu Asn Gln Gly His Glu Ile  
 275 280 285

Ala Ala Arg Gln Gln Lys Gly Phe Gly Ala Met Leu Ser Phe Glu Leu  
 290 295 300

Asp Gly Asp Glu Gln Thr Leu Arg Arg Phe Leu Gly Gly Leu Ser Leu  
 305 310 315 320

Phe Thr Leu Ala Ala Ser Leu Gly Gly Val Glu Ser Leu Ile Ser His  
 325 330 335

Ala Ala Thr Met Thr His Ala Gly Met Ala Pro Glu Ala Arg Ala Ala  
 340 345 350

Ala Gly Ile Ser Glu Thr Leu Leu Arg Ile Ser Thr Gly Ile Glu Asp  
 355 360 365

Gly Glu Asp Leu Ile Ala Asp Leu Glu Asn Gly Phe Arg Ala Ala Asn  
 370 375 380

Lys Gly  
 385

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Oligonucléotide DmetER

<400> 9	60
taccccccac gcaaggttctg cggcgctgc accatgttcg ccagtgccgc gcgggtttct	100
ggccagccgc gcgtttttag catatgaata tcctccttag	

<210> 10

<211> 100

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide DmetEF

<400> 10	60
tgacaatat att gaatcacacc ctcggtttcc ctcgcgttgg cctgcgtcgc gagctgaaaa	100
aagcgcaaga aagtatttgg tgtaggctgg agctgcttcg	

<210> 11

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide MetER

<400> 11	30
ggtttaagca gtatggtggg aagaagtcgc	

<210> 12

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide MetEF

<400> 12	30
cccggggatg aataaaacttg ccgccttccc	

<210> 13

<211> 100

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide DmetCR

<400> 13	60
ccggccgtcca gatcggtcaut cugalcgttcg acatcttccca gaccaalatg caggcgaatc	100
aaggccccgc taaaatcgat catatgaata tcctccttag	

<210> 14

<211> 100

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Oligonucléotide DmetCF

<400> 14  
cggacaaaaa gcttgatact caactggtga atgcaggacg cagcaaaaaa tacactctcg 60  
gcccggtaaa tagcgtgatt tgtaggctgg agctgcttcg 100

---

<210> 15  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Oligonucléotide MetCR

<400> 15  
cgtccgggac gccttgatcc cggacgcaac 30

---

<210> 16  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Oligonucléotide MetCF

<400> 16  
gcgtttacgc agtaaaaaag tcaccagcac gc 32

---

<210> 17  
<211> 100  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Oligonucléotide DmetJBF

<400> 17  
tatgcagctg acgaccctttc gcccctgcct gcgcaatcac actcatttt accccttgg 60  
tgcagccccgg aagccatttt caggcaccag agtaaacatt 100

---

<210> 18  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Oligonucléotide MetJR

<400> 18  
ggtagcggaaa ccagcaggct gaggatcagc 30

---

<210> 19  
<211> 41  
<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide MetLR

<400> 19

aaataaacact tcacatcagc cagactactg ccaccaaatt t

41

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235\*02

### DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° ... 1/1.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /26085

Vos références pour ce dossier (facultatif)	240589 D20701.FT
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0305768

**TITRE DE L'INVENTION** (200 caractères ou espaces maximum)

MICROORGANISME A ACTIVITÉ METHIONINE SYNTHASE MODIFIÉE ET PROCÉDÉ DE  
PRÉPARATION DE LA METHIONINE.

**LE(S) DEMANDEUR(S) :**

METABOLIC EXPLORER :

BIPOLE CLERMONT-LIMAGNE 63360 SAINT BEAUZIRE FRANCE - FRANCE

**DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :** (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs,  
utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).

Nom		CHATEAU Michel
Prénoms		
Adresse	Rue	Les Baumettes, Appt 47 - Bat E1 63200 RIOM
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		GONZALEZ Benjamin
Prénoms		
Adresse	Rue	4, rue Sidoine Apollinaire 63000 CLERMONT-FERRAND
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		SOUCAILLE Philippe, Noel, Paul
Prénoms		
Adresse	Rue	Chant du Coucou 31450 DEYME
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		15 octobre 03 Franck Tébey 94-1103 

**VCT/FR2004/000354**



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**